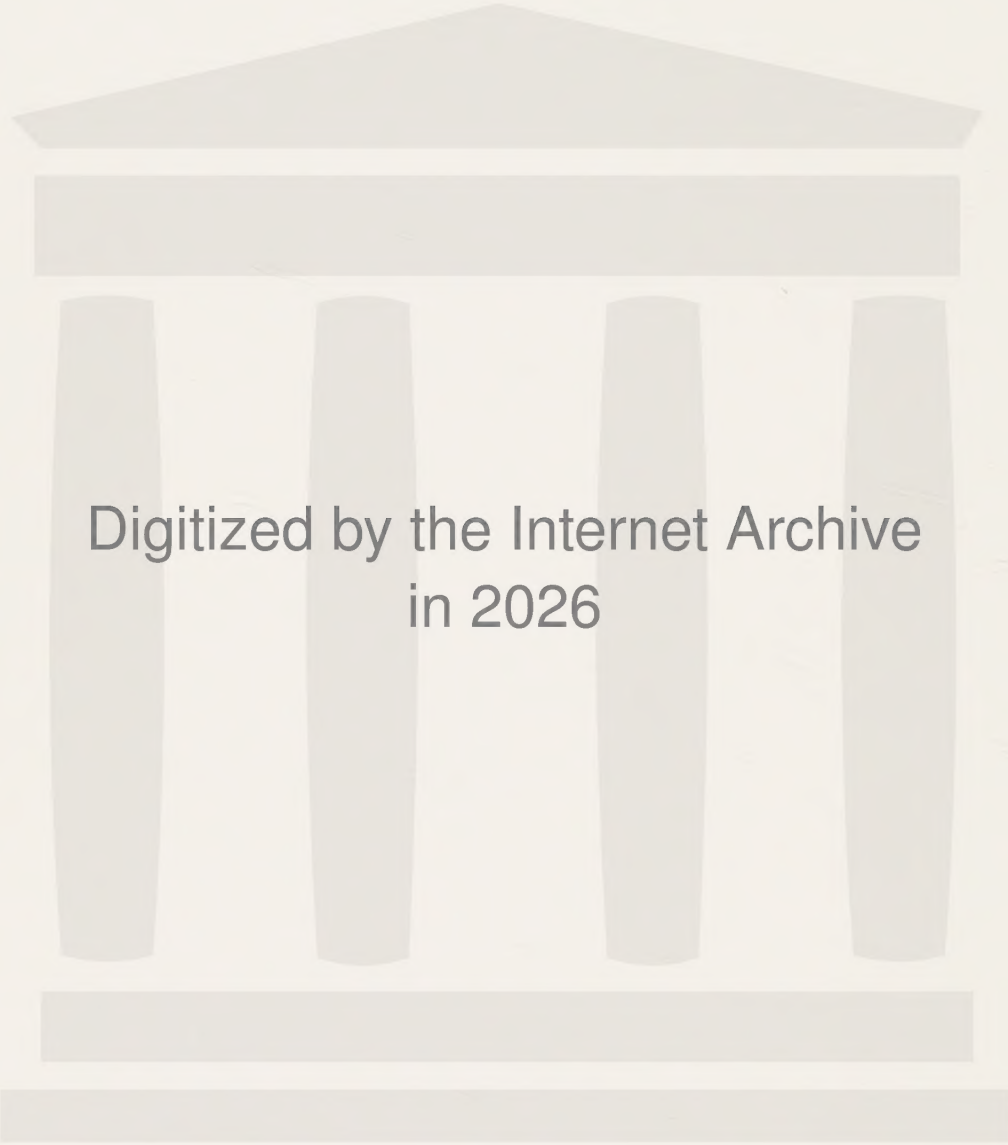


H. Freisler

Freiburg im Br 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545301_0003

Pyruvat-Decarboxylase:

Verbesserte Reindarstellung und
Charakterisierung

Versuche zur Darstellung und Trennung
der Bromcyanspaltpeptide

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i.Br.

vorgelegt von
Horst Freisler
aus
Oderberg-Stadt

1979



Dekan: Prof. Dr.H.Mohr

Leiter der Arbeit: Prof. Dr.J.Ullrich

Referent: Prof. Dr.J.Ullrich

Koreferent: Prof. Dr.H.Kössel

Tag der Verkündigung des Prüfungsergebnisses: 18.4.1980

Teile der vorliegenden Arbeit wurden
veröffentlicht in:

Ullrich, J. und Freisler, H. (1977)
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 358 , 318

Abkürzungsverzeichnis

ADH	- Alkohol-Dehydrogenase
Bis	- N,N'-Methylenbisacrylamid
CBB	- Coomassie brilliant blau
DFP	- Diisopropylfluorophosphat
IEP	- Isoelektrischer Punkt
IFPAG	- Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid- gel
MG	- Molekulargewicht
NAD	- β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	- β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid reduziert
PAGE	- Polyacrylamidgel - Elektrophorese
PDC	- Pyruvat-Decarboxylase
PMSF	- Phenylmethansulfonylfluorid
SDS	- Natriumdodecylsulfat
Temed	- N,N,N',N'-Tetramethyläthyldiamin
TPP	- Thiaminpyrophosphat
Tris	- Tris(hydroxymethyl) aminomethan

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Ergebnisse und Diskussion	3
1.0.0. Darstellung der PDC und Prüfung der Reinheit	3
1.1.0. Zusätzliche Verfahren zur Prüfung der PDC-Reinheit	6
1.1.1. SDS-PAGE	7
1.1.2. Diskontinuierliche PAGE	11
1.1.3. Kontinuierliche PAGE	12
1.1.4. Dünnschicht IFPAG	15
1.1.5. Bestimmung von Fremdenzym-Aktivitäten	16
1.2.0. Reinheits- und Aktivitätsprüfung käuflicher Handelspräparate der PDC	17
1.3.0. Zusammenfassende Diskussion der Reinheit und Stabilität zugänglicher PDC-Präparate	19
2.0.0. Versuche zur Verbesserung der Reindarstellung von PDC	20
2.1.0. Nachreinigung der nach Ullrich ⁴ gewonnenen PDC-Präparate	20
2.1.1. Nachreinigung des PDC-Holoenzym durch Gelfiltration	20
2.1.2. Nachreinigung des PDC-Apoenzym durch Gelfiltration	22
2.1.3. Chromatographie von PDC an Calciumphosphatgelen	24

2.1.4.	Gradientenelution der mit Ammonium-sulfat im Gel präzipitierten PDC	28
2.1.5.	Halbpräparative PAGE	30
2.2.0.	Ersatz der Sephadex G-200 Gel-filtration als Endreinigungsschritt der PDC-Darstellung durch andere Methoden	31
2.2.1.	Adsorption von PDC-Rohenzym an Alumina C γ im Batch-Verfahren	31
2.2.2.	Chromatographie von PDC-Rohenzym an Calciumphosphatgel	32
2.2.3.	DEAE-Cellulose Ionenaustauschchromatographie von PDC-Rohenzym	32
2.2.4.	CM-Sephadex Ionenaustauschchromatographie von PDC-Rohenzym	34
2.2.5.	Gradientenelution von mit Ammonium-sulfat im Gel präzipitiertem PDC-Rohenzym	37
2.3.0.	Versuche zur Reduktion proteolytischer Aktivität in den PDC-Präparaten	40
2.3.1.	Untersuchung der Proteasenaktivität in PDC-Präparaten	41
2.3.2.	Eignung der SDS-PAGE zur Reinheitsprüfung von Proteinen in Gegenwart von Proteasen	47
2.3.3.	Antiproteolytische Maßnahmen bei der PDC-Darstellung	51
2.3.4.	Zusammenfassende Ergebnisse der Untersuchung der proteolytischen Aktivität in den PDC-Präparaten	64
2.4.0.	Optimiertes Verfahren zur Darstellung gereinigter PDC	66
3.0.0.	Überarbeitung physikalischer Daten der PDC	70

3.1.0.	Molekulargewicht von Holo-, Apoenzym und Untereinheiten der PDC	70
3.1.1.	Molekulargewichtsbestimmung der PDC-Untereinheiten mit der SDS-PAGE	72
3.1.2.	Molekulargewichtsbestimmung von Holo- und Apoenzym der PDC mit Gelfiltration	78
3.1.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen	83
3.2.0.	Bruttoamino-säure-zusammensetzung der PDC	84
3.3.0.	IEP der PDC	86
4.0.0.	Darstellung von BrCN-Spaltpeptiden der PDC	89
4.1.0.	Spaltung der PDC mit BrCN	89
4.2.0.	Dünnschicht-Chromatographie der BrCN-Spaltpeptide	90
4.3.0.	Harnstoff-IFPAG der BrCN-Spaltpeptide	90
4.4.0.	SDS-PAGE der BrCN-Spaltpeptide	94
4.5.0.	Harnstoff-SDS-PAGE der BrCN-Spaltpeptide	94
5.0.0.	Vorversuche zur Trennung der BrCN-Spaltpeptide	95
5.1.0.	Gelfiltration der BrCN-Spaltpeptide	95
5.1.1.	Gelfiltration mit SDS-haltigem Elutionspuffer	95
5.1.2.	Gelfiltration der maleylierten BrCN-Spaltpeptide	96

5.1.3.	Gelfiltration der BrCN-Spaltpeptide in 50%iger Ameisensäure	97
5.2.0.	Ionenaustausch-Chromatographie der BrCN-Spaltpeptide	99
5.3.0.	Semipräparative Harnstoff-IFPAG der BrCN-Spaltpeptide	100
5.4.0.	Versuche zur Bestimmung der Molekular- gewichte der BrCN-Spaltpeptide	101
5.5.0.	Zusammenfassende Ergebnisse der Vor- versuche zur Darstellung und Trennung der BrCN-Spaltpeptide	103
C.	Materialien und Methoden	105
1.0.0.	Materialien	105
2.0.0.	Methoden	108
2.1.0.	Proteinbestimmungen	108
2.2.0.	Enzymaktivitätsbestimmungen	110
2.2.1.	Bestimmung von Proteaseaktivitäten	110
2.3.0.	Antiproteolytische Maßnahmen	111
2.3.1.	Zumischen von Hefekochsaft	111
2.3.2.	Erhitzung von Mazerationssaft bzw. Rohenzym	111
2.3.3.	Behandlung mit PMSF	111
2.4.0.	Säulenchromatographien	112
2.5.0.	Reinigung von PDC-Rohenzym	112
2.5.1.	Gelfiltrationen	112
2.5.2.	Chromatographie an Calciumphosphat- gelen	113

2.5.3.	Gradientenelution von mit Ammonium- sulfat in Gelen präzipitierter PDC	113
2.5.4.	Adsorption an Alumina C _γ	115
2.5.5.	Optimiertes Verfahren zur Darstel- lung von reiner PDC	115
2.6.0.	Färbeverfahren zur Darstellung von Proteinbanden in Polyacrylamidgelen	116
2.7.0.	PAGEs	118
2.7.1.	SDS-PAGE	118
2.7.2.	Harnstoff-SDS-PAGE	119
2.7.3.	Diskontinuierliche PAGE	120
2.7.4.	Kontinuierliche PAGE	120
2.8.0.	IFPAGs	121
2.8.1.	Dünnschicht-IFPAGs	121
2.8.2.	Harnstoff-IFPAGs in Röhrchen	123
2.9.0.	Spaltung von gereinigter PDC mit Bromcyan	124
D.	Zusammenfassung	126
E.	Literaturverzeichnis	128

A. Einleitung

Die cytoplasmatische Pyruvat-Decarboxylase (EC 4.1.1.1.) wurde bereits 1911 von Neuberg und Karczag¹ als Hefe-enzym beschrieben. Nachdem Lohmann und Schuster² das von Auhagen³ 1932 erstmals abgetrennte Coenzym der PDC als TPP identifiziert hatten, beschäftigten sich in der Folgezeit mehrere Arbeitsgruppen sehr eingehend mit diesem Enzym. Hauptursache für dieses Interesse war, daß die leichte Verfügbarkeit, zumindest von Rohpräparaten, die PDC zum geeigneten Objekt für das Studium TPP-katalysierter Enzymreaktionen prädestinierte.

Der zu Beginn dieser Arbeit in der Literatur ausgewiesene Stand der PDC-Forschung verlangte als nächsten Schritt die Aufklärung der Primärstruktur. Für diese Arbeit schienen die folgenden relevanten Voraussetzungen erfüllt zu sein:

1. Das Enzym war in ausreichenden Mengen reproduzierbar rein dargestellt worden.⁴
2. Die Frage der Untereinheiten war eingehend untersucht worden.⁵ Die Ergebnisse sprachen für zwei im Hinblick auf Größe und Sequenz identische Untereinheiten.
3. Das Molekulargewicht des intakten sowie des denaturierten Enzyms war bestimmt worden. Dabei ergab sich ein Wert von 170.000 - 175.000 für das Holoenzym und ein Wert von 85.000 - 90.000 für die Untereinheit.⁶
4. Die Brutto-Aminosäuren-Zusammensetzung der PDC war, auf der Basis eines Molekulargewichts von 170.000 und zweier identischer Untereinheiten, ermittelt worden.⁷

5. Fingerprints nach tryptischer und chymotryptischer Spaltung der PDC waren vorgelegt worden.⁸

Die vorliegende Arbeit sollte zunächst der Sicherung dieser Plattform dienen, zum anderen einen Weg zur Aufklärung der Primärstruktur der Hefe-PDC aufzeigen.

B. Ergebnisse und Diskussion

1.0.0. Darstellung der PDC und Prüfung der Reinheit.

Zur Reindarstellung der PDC wurde das von Ullrich⁴ angegebene Verfahren verwendet. Ullrich hatte die von Holzer et al.⁹ angegebene Methode zur Darstellung eines Rohpräparates der PDC modifiziert und als Endreinigungsschritt eine Gel-filtration über Sephadex-G 200 nachgeschaltet.

Mit diesem Verfahren wurden von Ullrich Enzympräparate mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 60 mU/mg erhalten.

Bei der Nacharbeitung des Reinigungsverfahrens von Ullrich konnten aus 3 g Rohenzympaste (ca. 500 - 800 mg Protein) mittels der Sephadex-G-200 Filtration bis zu 150 mg Protein mit einer spezifischen PDC-Aktivität von über 30 mU/mg erhalten werden. Damit entsprachen die Ergebnisse den von Ullrich beschriebenen.

Die Messung der spezifischen Aktivität wurde im kinetisch-photometrischen Test nach Holzer et al.¹⁰ entsprechend der Anleitung von Ullrich¹¹ durchgeführt. Dabei ist eine Aktivitätseinheit als die Enzymaktivität definiert, die die Decarboxylierung von einem μMol Pyruvat in einer Minute bei 30°C in einem 0,1 M Citratpuffer von pH-6 bewirkt. Die Konzentration von Pyruvat im Testansatz beträgt 0,033 Mol/l.

Die Proteinkonzentrationen wurden in einem modifizierten Biuretverfahren (vgl. Mat. u. Meth. 2.1.0.) bestimmt.

Im folgenden wird das Protokoll einer entsprechenden Enzymdarstellung wiedergegeben.

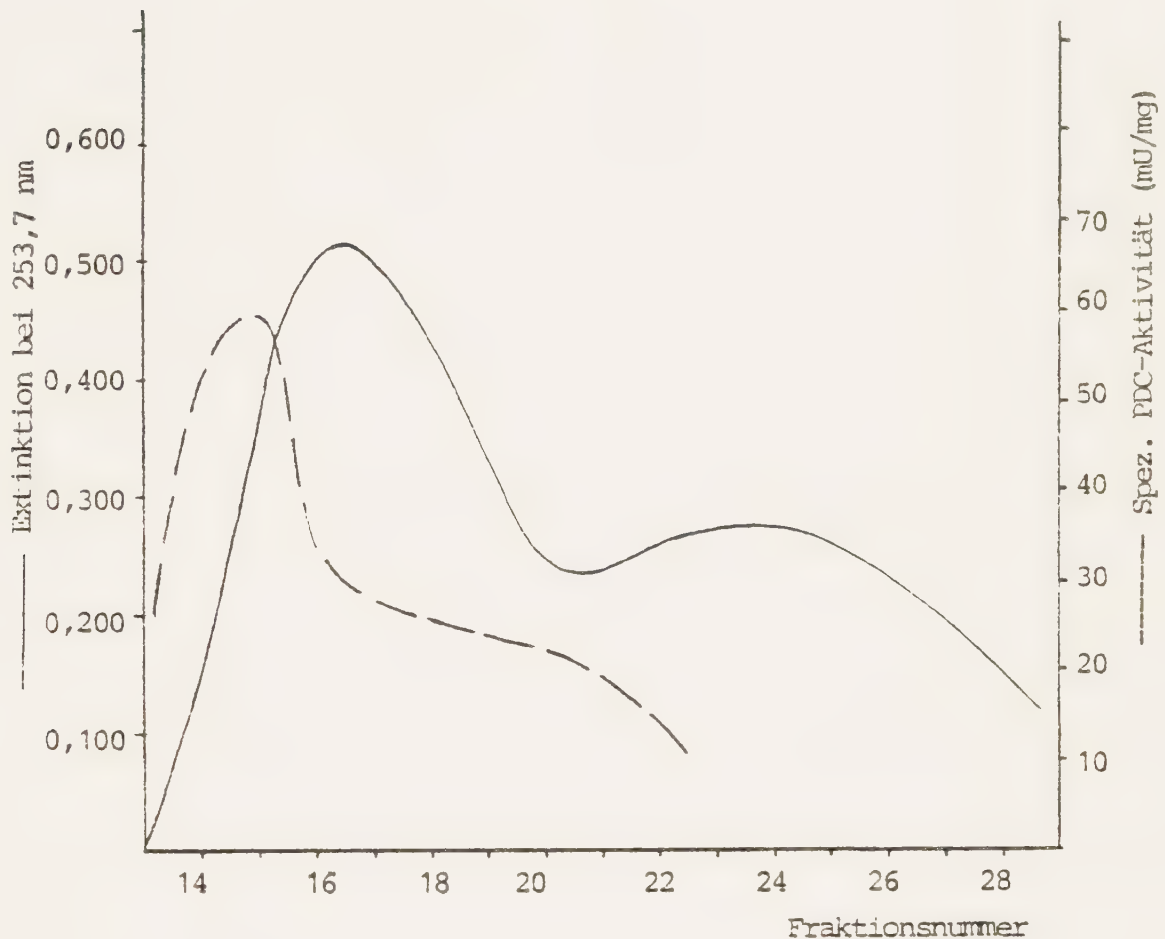


Abb. 1: Profil einer Filtration von Roh-PDC über Sephadex G-200.

Enzymaufgabe: 3 g Paste in 3 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8. Säulenmaße 100 x 5 cm; Gelbethöhe ca. 90 cm. Elution mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8, Elutionsgeschwindigkeit 40 ml/h, Fraktionsvolumen 20 ml.

———— Extinktion bei 253,7 nm
----- Spezifische Aktivität (mU/mg).

Fraktion Nr.	Protein mg/ml	PDC-Aktivität mU/ml	Spez. PDC-Aktivität mU/mg
13	0,2	8,2	41
14	0,4	23,2	58
15	0,9	49,5	55
16	1,7	49,3	29
17	2,0	54,0	27
18	1,7	39,1	23
19	1,6	33,6	21
20	0,9	14,4	16

Tab. 1: Proteinausbeute und PDC-Aktivität einer Sephadex G-200-Filtration von PDC-Rohenzym (Fraktionsvolumen ca. 20 ml).

Im allgemeinen wurden die ersten 5 Fraktionen à 20 ml für die Versuche an der PDC eingesetzt. Leider erwies sich das Herstellverfahren und hier besonders der Endreinigungsschritt als sehr schlecht reproduzierbar. Nur in etwa 5% aller Präparationen wurde Enzym in der oben beschriebenen Qualität erhalten. Im allgemeinen lagen die höchsten spezifischen Aktivitäten um 30 mU/mg. Auch die Proteinausbeute in den ersten 5 Fraktionen lag häufig nur in der Größenordnung von 50 - 80 mg. Auch Ullrich berichtete von unterschiedlicher Qualität der verschiedenen Präparationen¹⁰, doch lag die durchschnittliche Qualität seiner Trennungen erheblich über der hier erhaltenen. Als mögliche Ursache für die großen Chargenunterschiede diskutierte Ullrich, in Anlehnung an die von Günther¹³ für PDC aus E.coli publizierten Befunde, Schwankungen in der Magnesium-Versorgung während des Hefewachstums in den Brauereien. Diese Vermutung konnte in späteren Versuchen allerdings nicht gestützt werden.¹⁴

Die Qualität des Rohenzym schwankte zwischen spez. Aktivitäten von 5 mU/mg bis 40 mU/mg. Die Güte der Trennergebnisse war aber keineswegs proportional der Rohenzymqualität, wie die Filtration verschiedener Rohenzymchargen über dieselbe Säule zeigte. Die Verarbeitung von Rohenzym mit einer spez. Aktivität unter 15mU/mg lohnte sich jedoch im allgemeinen nicht.

Proben derselben Charge Rohenzym lieferten bei Filtration über dieselbe Säule weitgehend identische Präparate. Bei häufigerer Benutzung einer Säule wurde allerdings die Ausbeute schlechter, was auf eine zunehmende Verstopfung der Säulen deutete. Eine Säulenfüllung konnte selten öfter als fünfmal benutzt werden. Wie die Filtration von Proben aus einer Rohenzymcharge über verschiedene Säulen zeigte, bestimmten neben der Packqualität der einzelnen Säulen auch unterschiedliche Sephadexchargen sehr stark das Trennergebnis.

1.1.0. Zusätzliche Verfahren zur Prüfung der PDC-Reinheit

Nun reichte die spezifische Aktivität als Reinheitskriterium für die PDC natürlich nicht aus.

Ullrich hatte zusätzlich die Ergebnisse der photographischen Auswertung mit der Schlierenoptik von Sedimentations- und Unterschichtungsläufen in der Analyt. Ultrazentrifuge herangezogen. Er erhielt mit Proben der 1. PDC-haltigen Fraktion von G-200-Filtrationen einen einheitlichen Gipfel¹⁴, während Nachlaufgipfel bei den folgenden Fraktionen bereits auf verunreinigende Begleitproteine deuteten⁶.

Natürlich war der Einsatz der Ultrazentrifuge zur Reinheitsprüfung zu aufwendig. Es wurde deshalb nach anderen, für den Routineeinsatz geeigneten, Methoden gesucht.

1.1.1. SDS PAGE

Besonders geeignet erwies sich hier die SDS-PAGE in 5% , 7,5% und 10%igen Polyacrylamidgelen nach Shapiro, Viñuela und Maizel¹⁵ in der Modifikation von Weber and Osborn¹⁶. Die nach Denaturierung in SDS durch Bindung von Dodecylsulfat-Anionen negativ geladenen Proteinmoleküle werden dabei durch den Molekularsiebeffekt der Gele hauptsächlich entsprechend der Größe der Molekulargewichte getrennt. Fixiert und gefärbt wurden die Gele mit CBB-R 250 in einem Methanol-Eisessig-Gemisch, entfärbt mit einem Methanol-Essigsäuregemisch oder elektrophoretisch in 5%iger Essigsäure¹⁰ (vgl. aber B 4.3.0. bzw. C 2.6.0.). Nach Ullrich und Kempfle⁵ besteht die PDC aus 2 Untereinheiten von gleicher Größe und vermutlich gleicher Sequenz. Bei reiner PDC war also eine einheitliche Bande in der SDS-PAGE zu erwarten. Das Ergebnis der Untersuchung der ersten Fraktionen von Sephadex-G 200 Gelfiltrationen ist aus Abbildung 2 ersichtlich. Aufgebracht wurden 50 µl Proteinlösung der Konzentration 0,8 bis 1 mg/ml. Damit war gewährleistet, daß auch kleine Mengen Begleitproteine noch gut sichtbar wurden.



Abb. 2: SDS-PAGE nach Weber und Osborn¹⁶ der ersten 5 Fraktionen einer Sephadex-G 200 Gelfiltration von PDC-Rohenzym (ca. 50 μ g Protein-Auftrag pro Gel) in 70 x 6 mm Röhrchen.

Nur bei wenigen Präparationen fand sich in Fraktion 13 nur eine Bande. Ab Fraktion 14 zeigte sich regelmäßig ein Begleitprotein mit etwas geringerem Molekulargewicht, dessen Konzentration mit steigender Fraktionsnummer zunahm. Spätestens ab Fraktion 17 fand sich regelmäßig auch eine 3. Bande.

Die densitometrische Auswertung der SDS-PAGE
einer optimalen Trennung ergab folgendes Bild:

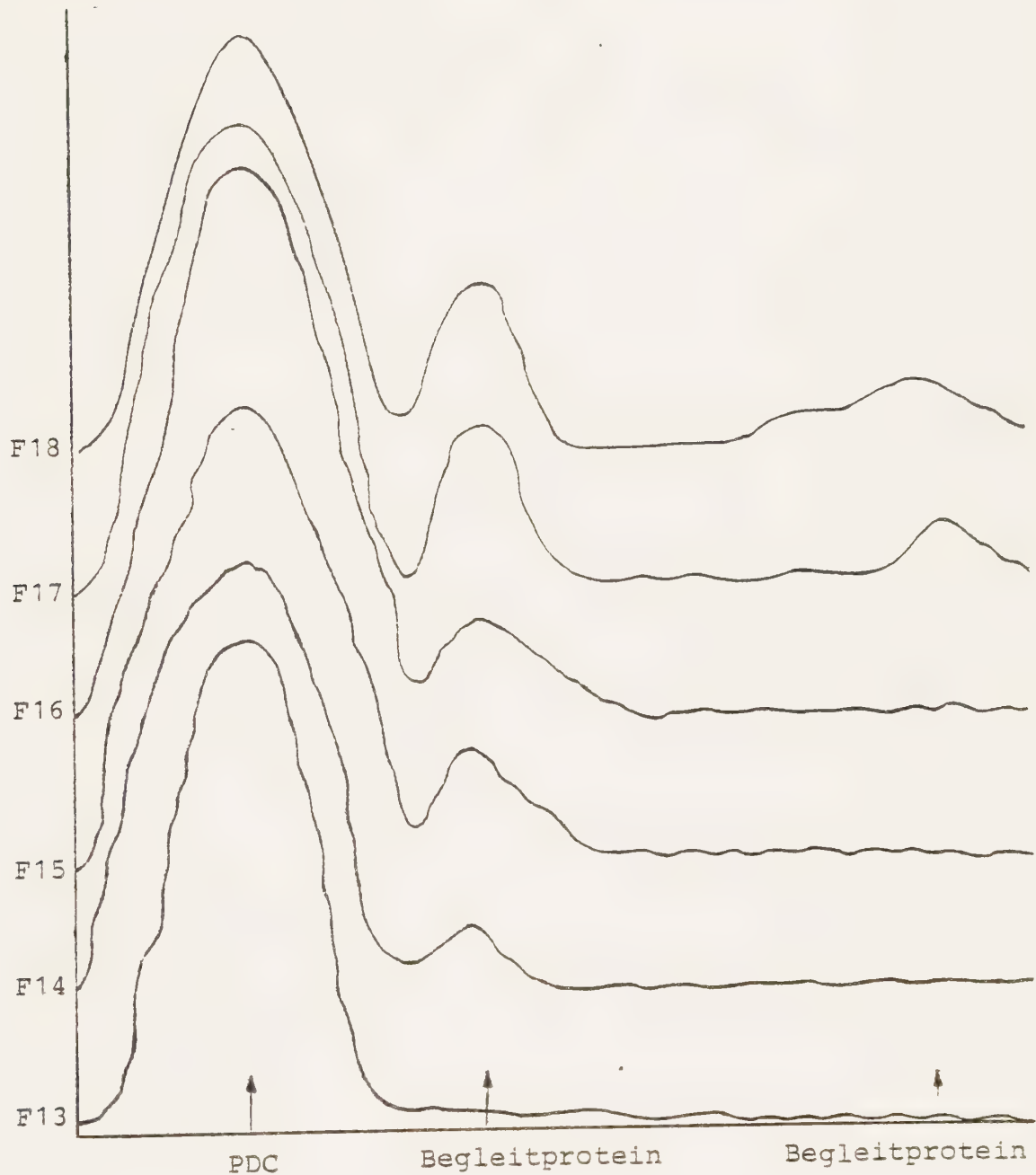


Abb. 3: Densitogramm der Gele einer SDS-PAGE nach
Weber und Osborn¹⁶ in 70 x 6 mm Röhrchen der
Fraktionen 13 - 18 einer Sephadex-G 200 Gel-
filtration von PDC-Rohenzym (vgl. Abb. 2).
Die Auswertung erfolgte mit dem Chromoscan
von Joice Loeb1.

Die Integration der Kurven mit dem Chromoscan von Joice Loeb1 ergab folgende prozentuale Protein-Verteilung:

Fraktion	Bande 1 (PDC)	Bande 2	Bande 3
F ₁₃	100%	-	-
F ₁₄	94%	6%	-
F ₁₅	90%	10%	-
F ₁₆	90%	10%	-
F ₁₇	81%	14%	5%
F ₁₈	71%	18%	11%

Tabelle 2: Auswertung des Densitogramms von Abb. 3 durch Integration. Proteinanteil der einzelnen Banden in % am Gesamtprotein.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurden die Fraktionen 13 bis 18 von etwa 30 verschiedenen Gelfiltrationen mit der SDS-PAGE nach Weber und Osborn¹⁶ geprüft. Im Optimalfall ergab sich ein Bild entsprechend Abb. 2, oben. Bei vielen Präparationen zeigten auch schon die ersten Fraktionen mehrere Begleitproteine.

1.1.2. Diskontinuierliche PAGE

Die Befunde am denaturierten Enzym wurden anschließend am nativen Protein überprüft. Im Vordergrund stand dabei die Frage, ob möglicherweise die 2. Komponente nur eine Folge der Denaturierung war, z.B. also durch definierte Spaltung einer Untereinheit unter Denaturierungsbedingungen entstand, oder ob die PDC möglicherweise sogar aus 2 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist. Gegen beide Annahmen sprach allerdings bereits, daß in einigen F13-Fraktionen die 2. Komponente überhaupt nicht gefunden wurde und daß die Konzentration der 2. Komponente mit steigender Fraktionsnummer zunahm.

Die Wahl der Bedingungen für die diskontinuierliche PAGE wurde einmal eingeschränkt durch die Tatsache, daß bei pH-Werten um 8 TPP und Magnesium zunehmend vom Holoenzym abdissoziieren und sich das Apoenzym bildet¹⁷, zum anderen, daß die PDC bei pH-Werten unter 6 als instabil gilt¹⁴. Ähnliche Hinweise gaben Gounaris et al.¹⁸ auch für PDC aus Bäckerhefe.

Am ehesten entsprach ein von Maurer¹⁹ angegebenes Trennsystem den durch die Instabilität des PDC-Holoenzym diktieren Bedingungen. Für das Trenngel (7,5% Acrylamid, 0,2% Bis) wird ein pH-Wert von 7,5, für das Sammelgel (2,5 % Acrylamid, 0,6% Bis) von 5,5 gewählt, als Elektrodenlösung diente ein Diäthyl-Barbitursäure/Tris-Puffer von pH 7.

Bei Vorversuchen zeigte sich eine äußerst langsame Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in den Gelen. Aufgetragen wurden Fraktionen 14 und 15 einer guten G-200-Sephadex-Gelfiltration. Bei allen Versuchen mit diesem Verfahren zeigten sich, wie mit SDS denaturierten Enzym, zwei eng zusammenliegende

Banden. Der prozentuale Anteil der langsamer wandernden Fraktion lag in der Größenordnung von 80 - 90%.

1.1.3. Kontinuierliche PAGE

Versuche mit einem kontinuierlichen Puffersystem lieferten in etwa die gleichen Ergebnisse hinsichtlich Wanderungsgeschwindigkeit und Trennschärfe. Hjertén et al.²⁰ hatten auf die Möglichkeit hingewiesen, daß auch in kontinuierlichen Systemen gute Trenneffekte erzielt werden können, vorausgesetzt, daß von engen Startzonen ausgegangen wird. Diese können erhalten werden, wenn die Proben in Pufferlösungen aufgebracht werden, die eine niedrigere Ionenstärke als die Elektroden-Puffer besitzen. Verwendet wurde hier ein 5%iges Gel und ein Tris-Phosphatpuffer von pH 6,8 (0,2 M zum Ansatz des Gels, 0,04 M als Elektrodenpuffer). Die Proben (Konzentration 0,8 mg/ml) waren vorher gegen 0,02 M Tris-Phosphatpuffer dialysiert worden und wurden auch in diesem Puffer aufgebracht (jeweils 50 µl).

Versuche, nach Schneiden der Gele und Eluieren in Phosphatpuffer PDC-Aktivität im Eluat zu entdecken, scheiterten. Gleichzeitig war versucht worden, die beiden Proteinbanden durch Schneiden zu isolieren und getrennt nach Denaturierung in eine SDS-PAGE einzubringen. Dazu waren die Banden in einem Gel durch Färbung mit CBB-R250 angefärbt und die übrigen Gele entsprechend dieser "Schablone" geschnitten worden. Durch die Veränderung der Gele beim Färben und Entfärben war die Zuordnung jedoch sehr schwierig. Es gelang nicht, die beiden Banden isoliert in der SDS-PAGE darzustellen.

Beide Versuche glückten, als das oben beschriebene Verfahren der kontinuierlichen PAGE im halbpräparativen Maßstab (160 x 9 mm Röhrchen) durchgeführt wurde. Es wurde bei diesen Versuchen jeweils das Gelstück, in dem nach dem Schneiden die schneller wandernde Bande enthalten sein mußte, wie üblich gefärbt und entfärbt. Nur wenn diese Bande komplett im angefärbten Gelstück enthalten war, wurde das andere Gelstück mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8 eluiert und das Eluat für die PDC-Aktivitätstests herangezogen. Dabei konnte gezeigt werden, daß die langsamer wandernde Bande PDC-Aktivität besitzt und nach Denaturierung auch nur eine Bande in der SDS-PAGE ergibt. Es gelang auch, beide Banden nach Schneiden und Eluieren des Gels in der SDS-PAGE getrennt darzustellen (vgl. Abb. 4).



Abb. 4: SDS-PAGE nach Weber und Osborn¹⁶ der durch Schneiden des Gels einer kontinuierlichen PAGE getrennten zwei Banden in PDC-Präparaten (F_{14} einer Sephadex G-200 Filtration).

- a. Probe des in die kontinuierliche PAGE eingebrachten Präparats nach Denaturierung in der SDS-PAGE.
- b. PDC-Bande in der SDS-PAGE.
- c. Begleitprotein mit MG von ca. 48.000 in der SDS-PAGE.

Nach diesen Versuchen kann als sicher gelten, daß die zweite Bande, die sich in den SDS-PAGES von gereinigter PDC zeigt, weder eine weitere Untereinheit noch ein Spaltprodukt der PDC ist. Es handelt sich eindeutig um ein verunreinigendes Fremdprotein.

1.1.4. Dünnschicht-IFPAG

Als weiteres, sehr empfindliches Verfahren zur Reinheitsprüfung wurde die IFPAG auf Dünnschichtplatten eingesetzt.

Die Dünnschicht-Platten wurden, im Hinblick auf die Ampholine-Auswahl und die Konzentration geringfügig modifiziert, entsprechend Karlsson et al.²¹ hergestellt. Es kamen Platten in einem pH-Bereich von 3,5 bis 9,5 zur Festlegung des ungefähren IEPs und dann Platten in einem pH-Bereich von pH 4,5 bis 6,5 zum Einsatz.

Später standen auch die Ampholine^R PAG plates der Firma LKB in einem pH-Bereich von 3,5 bis 9,5 zur Verfügung. In allen Fällen zeigten sich bei der Elektrofokussierung der PDC mehrere Banden. Auch wenn eine Fraktion 13 verwendet wurde, die in der SDS-PAGE eine einheitliche Bande zeigte, ergaben sich neben der PDC-Bande weitere, meist verschmierte Banden, deren IEPs höher als der der PDC lag. Wurden Fraktionen genommen, die in der SDS-PAGE eine 2. Bande zeigten, fand sich in der Dünnschicht-IFPAG zusätzlich eine an der PDC liegende Bande (vgl. Abb. 5).



Abb. 5: IFPAG einer Fraktion 16 aus einer Sephadex-G-200 Gelfiltration von Roh-PDC auf LKB-Ampholine^R-PAG-plates. Versuchsbedingungen, geringfügig modifiziert, entsprechend Arbeitsanleitung von LKB.

1.1.5. Bestimmung von Fremdenzym-Aktivitäten

Es ist bekannt, daß PDC-Präparate häufig Fremdaktivitäten von ADH, LDH, NADH-Oxidase zeigen.²²

Deshalb wurden die Fraktionen 13 bis 18 einer Sephadex-G-200 Gelfiltration systematisch auf Aktivitäten der genannten Enzyme untersucht. Möglicherweise könnten damit die in der SDS-PAGE in PDC-Präparaten gefundenen Begleitproteine als bestimmte Enzyme identifiziert werden, was deren Abtrennung sicher erleichtert hätte.

Die ADH-Aktivität wurde entsprechend Bergmeyer²³ im kinetisch-photometrischen Test durch kontinuierliche Registrierung der mit der Oxidation von Äthanol verbundenen NADH-Zunahme bei 366 nm bestimmt.

Die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität wurde nach Wieland²⁴ im kinetisch-photometrischen Test durch kontinuierliche Registrierung der mit der Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat (III) verbundenen Entfärbung bei 405 nm bestimmt.

Die NADH-Oxidase-Aktivität wurde nach Green und Ziegler im kinetisch-photometrischen Test²⁵ durch kontinuierliche Registrierung der NADH-Abnahme bei 366 nm bestimmt. Bei allen Enzymbestimmungen wurden die in den Tests eingesetzten Volumina der PDC-Lösungen mehrfach gesteigert (bis zu einer Konzentration von 0,02 mg/ml im Enzymtest-Ansatz), um auch schwache Fremdaktivitäten zu erfassen.

Untersucht wurden mehrere verschiedene Präparate.

In den meisten Präparaten wurde ADH-Aktivität gefunden, niemals jedoch wurden Aktivitäten der LDH bzw. NADH-Oxidase nachgewiesen. Die folgende Tabelle zeigt einen Vergleich der spezifischen PDC- und ADH-Aktivitäten einer typischen PDC-Präparation. Es wurden die ersten 6 Fraktionen einer Sephadex-G-200 Gelfiltration untersucht.

Fraktions- nummer	Protein mg/ml	PDC-Aktivität mU/mg	ADH-Aktivität mU/mg
F ₁₃	0,24	42	-
F ₁₄	0,43	58	-
F ₁₅	0,44	56	0,2
F ₁₆	1,65	28	0,4
F ₁₇	2,02	29	2
F ₁₈	1,73	30	6

Tab. 3: Proteingehalt, PDC- und ADH-Aktivitäten
der Fraktionen 13 - 18 einer Sephadex-
G-200-Gelfiltration von PDC-Rohenzym.

Daraufhin wurde von den oben untersuchten Präparaten das mit der höchsten ADH-Aktivität in eine SDS-PAGE eingesetzt. Gleichzeitig wurde ein Gel mit käuflicher ADH aus Hefe, die wie üblich in SDS denaturiert worden war, beschickt. Im Vergleich wurde versucht, eines der Begleitproteine der PDC-Präparate der ADH zuzuordnen. Die Versuche blieben ohne Ergebnis, was in Anbetracht der geringen ADH-Aktivitäten, die gemessen wurden, nicht überraschte.

1.2.0. Reinheits- und Aktivitätsprüfung käuflicher Handelspräparate der PDC.

PDC aus Bierhefe wurde von den Firmen Boehringer Mannheim und Sigma, Chemical Company, St. Louis, Mo., USA angeboten. Die spezifische Aktivität beider Präparate lag bei Erhalt um 25 mU/mg. Die Stabilität war schlechter als der Durchschnitt der selbst herge-

stellten Chargen. Die Aktivitätsverluste innerhalb von 2 Monaten Lagerung bei 4°C lagen bei dem Präparat von Boehringer Mannheim bei 60%, bei dem von Sigma bei 70%. Die SDS-PAGE zeigte in beiden Präparaten eine Reihe von Zusatzbanden (vgl. Abb. 6). Boehringer Mannheim gab auf Befragen an, die PDC nicht absolut gereinigt zu haben, sondern nur soweit, als es für analytische Zwecke notwendig sei²⁶. Sigma konnte zur Reinheit seines PDC-Präparates keine Angaben machen²⁷.



Abb. 6: SDS-PAGE nach Weber und Osborn¹⁶ eines nach Ullrich dargestellten PDC-Präparates (a) im Vergleich mit den PDC-Handelspräparaten von Boehringer, Mannheim (b) und Sigma, St.Louis (c).

Boehringer hat sein Präparat inzwischen aus dem Handel genommen, weil "es den Kunden nicht länger zugemutet werden konnte, ein Enzym zu kaufen, das innerhalb von 3 - 6 Monaten etwa 50% seiner Aktivität bei der Lagerung verliert"²⁶.

1.3.0. Zusammenfassende Diskussion der Reinheit und Stabilität zugänglicher PDC-Präparate.

Alle zur Reinheitsprüfung der nach Ullrich⁴ gewonnenen Präparate eingesetzten Verfahren zeigten, daß, wenn überhaupt, nur 1 bis 3 mg PDC ohne Begleitproteine sind, nämlich nur die PDC in der ersten PDC-Aktivität zeigenden Fraktion der Sephadex G-200-Gelfiltration (F 13). In den folgenden Fraktionen kam in steigender Konzentration ein Begleitprotein dazu. Die Konzentrationen dieses Proteins lagen bei 5 bis 10% in Fraktion 14 und stiegen in folgenden Fraktionen an. Spätestens ab Fraktion 17 zeigten sich zusätzliche Begleitproteine. Diese Befunde könnten auch die Erklärung für das bisherige Scheitern von Versuchen zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure der PDC darstellen. Kremer⁸ hatte umfangreiche Untersuchungen angestellt und Isoleucin als wahrscheinliche N-terminale Aminosäure bestimmt. Er erhielt jedoch bei bestimmten Lösungsmittelkombinationen in der zweidimensionalen Kieselgel-Dünnschichtchromatographie des Säurehydrolysats dansylierter PDC reproduzierbar 2 Flecken, von denen er einen als Isoleucin identifizierte, während er den anderen nicht zuordnen konnte. Während Kremer als mögliche Erklärung das Vorhandensein von zwei verschiedenen Untereinheiten der PDC diskutierte, dürfte es sich bei einem der Flecken, vermutlich dem nicht identifizierten, in Einklang mit obigen Untersuchungen um die N-terminale Aminosäure eines Begleitproteins handeln. Eigene Versuche in einer von Begleitproteinen freien F13-Fraktion die endständige N-Aminosäure entsprechend der von Kremer eingesetzten Methode zu bestimmen, scheiterten, weil zu diesem Zeitpunkt die vorhandenen Reinenzymmengen für das von Kremer eingesetzte Verfahren zu gering waren. Bevor weitere Untersuchungen an der PDC vorgenommen werden konnten, mußte deshalb versucht werden, die Ausbeute an völlig reiner PDC zu verbessern.

2.0.0. Versuche zur Verbesserung der Reindarstellung von PDC.

Zunächst wurden zur Verbesserung der Reindarstellung der PDC einige Versuche mit Säulen anderer Abmessungen und mit anderen Trennmitteln durchgeführt.

Das bisher eingesetzte Sephadex G-200 neigte sehr leicht zum Verstopfen. Außerdem war die Packqualität der Säulen und damit die Trenneigenschaft von Füllung zu Füllung sehr unterschiedlich. Während Ultrogel der Fa. LKB als Trennmittel keine Verbesserung brachte, erwiesen sich Filtrationen mit Sepharose 6B als Säulenfüllmaterial etwas besser reproduzierbar, zumal wenn zusätzlich kleinere Säulen (110 x 2 cm) genommen wurden. Auf diese Säulen konnte allerdings nur 1 g Rohenzympaste (ca. 200 mg Protein) aufgebracht werden.

Im folgenden wurde sowohl versucht, das nach Ullrich⁴ gewonnene, gereinigte Enzym durch ein zusätzliches Verfahren nachzureinigen, als auch die Gelfiltration als Endreinigungsschritt durch andere Verfahren zu ersetzen.

Daneben wurde nach zusätzlichen Maßnahmen gesucht, um die Qualität und Stabilität der PDC zu verbessern.

2.1.0. Nachreinigung der nach Ullrich gewonnenen PDC-Präparate.

2.1.1. Nachreinigung des PDC-Holoenzym durch Gelfiltration

Zunächst wurde versucht, die nach Ullrich⁴ über eine Sephadex G-200 Gelfiltration gereinigten Präparate durch eine weitere Gelfiltration nachzureinigen. Dazu wurden die Fraktionen 13 bis 18 (vgl. Abb.1, Tab.1) einer Sephadex G-200-Gel-

filtration gepoolt (ca. 100 mg Protein), mit Ammoniumsulfat gefällt, abzentrifugiert und in 1 ml 0,05 M Phosphatpuffer von pH 6,8 gelöst und erneut auf eine mit Sephadex G-200 gefüllte Säule (110 x 5 cm) aufgebracht. Die PDC wurde in einem leicht asymmetrischen Peak eluiert.

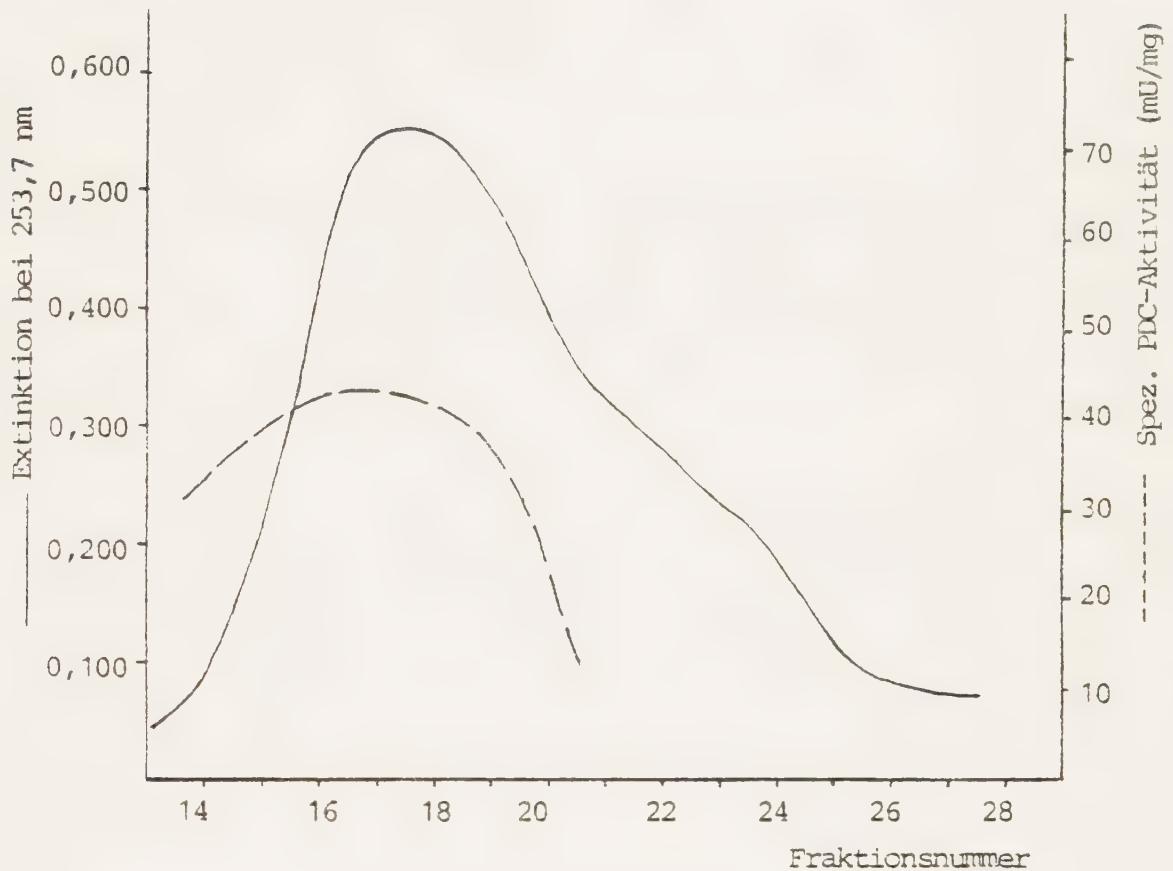


Abb.7: — Profil einer zusätzlichen Sephadex G-200-Gelfiltration der Fraktionen 13 - 18 (vgl. Abb.1) nach Ullrich gereinigter PDC. Versuchsbedingungen vgl. Abb. 1.
—— Extinktion bei 253,7 nm
----- Spez. PDC-Aktivität

Jeweils die einander entsprechenden Fraktionen 14, 16, 18 und 20 der ersten und zweiten Gelfiltration wurden in eine SDS-PAGE eingebracht. Die Gele wurden wie üblich gefärbt und mit dem Chromoscan densitometrisch ausgewertet. Außerdem wurde die spezifische Aktivität in den genannten Fraktionen ermittelt.

Fraktionen	% - Gehalt PDC		mU/mg PDC		mg/ml Protein	
	1. Filtr.	2. Filtr.	1. Filtr.	2. Filtr.	1. Filtr.	2. Filtr.
F ₁₄	91	95	45	30	0,1	0,1
F ₁₆	80	85	40	38	1,8	1,3
F ₁₈	70	76	51	37	2,6	1,7
F ₂₀	68	75	21	18	1,7	1,2

Tabelle 4: PDC-Gehalt und spezifische Aktivität verschiedener, einander entsprechender Fraktionen einer PDC-Darstellung nach einmaliger und zweimaliger Sephadex G-200 Gelfiltration im Vergleich.

Wie Tabelle 4 zeigt, führt die zusätzliche Gelfiltration über Sephadex G-200 zwar zu einer etwas verbesserten Reinheit der PDC, vermindert die Gesamtausbeute aber um ca. 30% und verursacht einen Aktivitätsverlust von ca. 25%. Die zusätzliche Gelfiltration wurde deshalb nicht in das Darstellungsverfahren aufgenommen.

2.1.2. Nachreinigung des PDC-Apoenzym durch Gelfiltration

Hauptproblem bei der Endreinigung der PDC bleibt die Abtrennung eines Fremdproteins, das, wie sich in der SDS-PAGE zeigt, nach Denaturierung aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 48.000 besteht. In der Gelfiltration über Sephadex G 200 oder Sepharose 6B äußert sich dieses Begleitprotein durch eine dem PDC-Peak nachfolgende Schulter (vgl. Abb. 1, Seite 4). Da das Molekulargewicht der PDC bei pH-Werten über 8 (Apoenzym) bei ca. 120.000 liegt (vgl. B3.1.2.) wurde versucht, durch eine Sephadex G-200 Gelfiltration des PDC-Rohenzym bei pH 8 bzw. alternativ pH 9 eine bessere Abtrennung zu erzielen.

Die Peaks von Begleitprotein und Apoenzym überlagerten sich jedoch bei diesen Versuchsbedingungen (vgl. Abb.8).

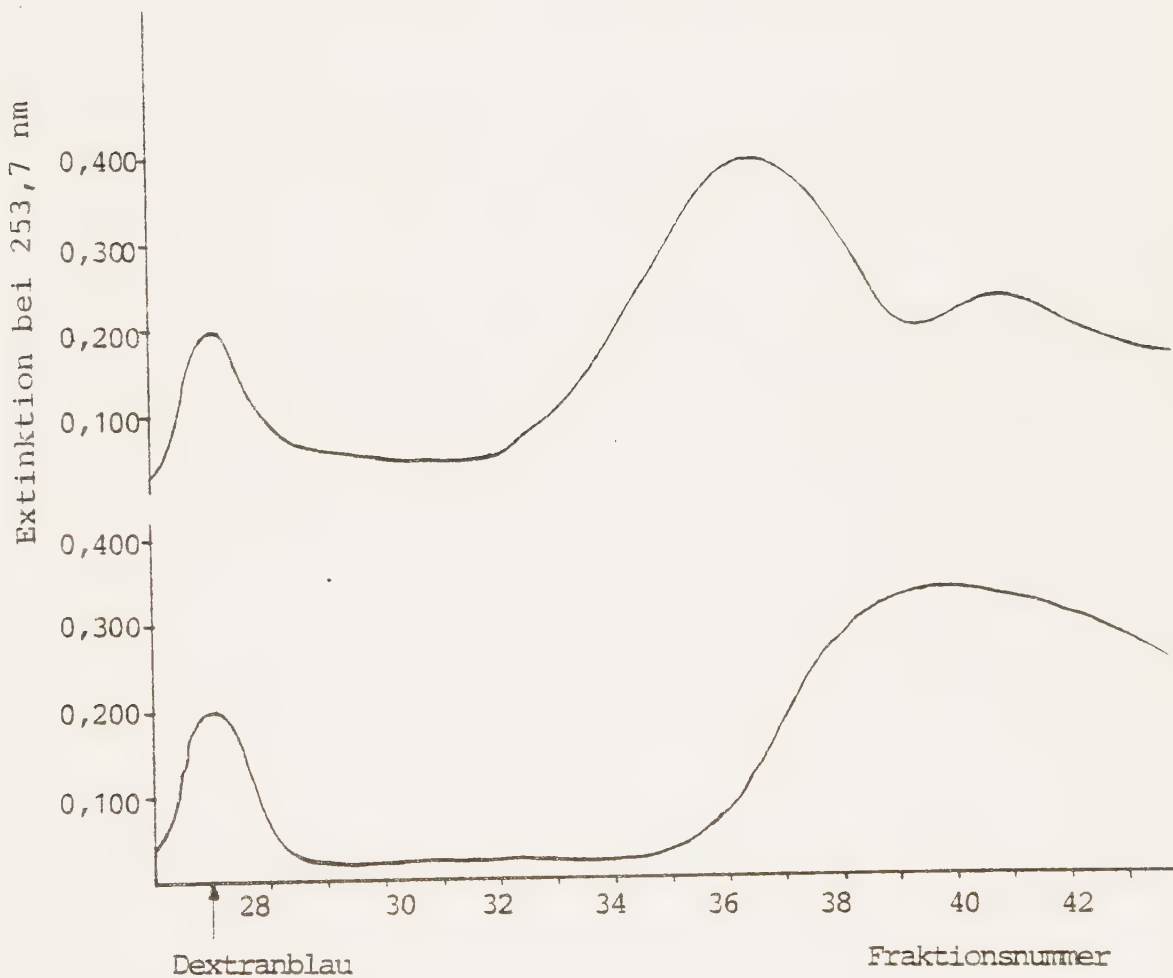


Abb.8: Gelfiltration von Roh-PDC bei verschiedenen pH-Werten über Sephadex G-200. Oben Elutionsprofil bei pH 7, unten Elutionsprofil bei pH 8, jeweils mit Dextranblau (Peak 1) als Indikator. Säulenmaße: 110 x 2 cm; Gelbetthöhe ca. 90 cm, Elutionsgeschwindigkeit 16 ml/h; Fraktionsvolumen 3,2 ml.

Im Eluat der Gelfiltrationen bei pH 8 und 9 konnten auch nach Inkubation des Apoenzyms mit Magnesiumsulfat und TPP nur ca. 10 % der ursprünglichen PDC-Aktivität gefunden werden. In der SDS-PAGE wurden in den Fraktionen des Peaks keine PDC-Bande mehr, sondern nur verschmierte, niedermolekulare Banden gefunden, wenn bei pH 8 filtriert wurde. Diese niedermolekularen Banden waren zwar auch in den Fraktionen der Filtration bei pH 9 vorhanden, doch zeigte sich hier auch noch die PDC-Bande.

Diese unterschiedlichen Befunde bei pH 8 und pH 9 konnten zunächst nicht gedeutet werden. Später (vgl. B 2.3.1.) bot sich dafür eine plausible Erklärung an.

Die Versuche zeigten, daß das Apoenzym offensichtlich in niedermolekulare Bestandteile gespalten wird, wenn es längere Zeit bei pH-Werten über 8 gehalten wird. Dieser Vorgang verläuft offensichtlich bei pH 8 schneller als bei pH 9. Die Instabilität des Apoenzyms war auch von anderen Autoren erwähnt worden.⁴

Eine Alternative zur Trennung bei pH 6,8 bot die Filtration bei Werten über pH 8 demnach nicht.

2.1.3. Chromatographie von PDC an Calciumphosphatgelen

Seit den Arbeiten von Tiselius, Hjertén und Levin²⁸ ist bekannt, daß die Chromatographie von Proteinen an Calciumphosphatgelen ein sehr wirksames Verfahren bei vielen Trennproblemen darstellt. Besonders dort, wo Komponenten mit ähnlichem Molekulargewicht und weitgehend identischem IEP getrennt werden sollen, bietet sich dieses Verfahren an.²⁹

Im folgenden wurde deshalb versucht, durch Chromatographie an Calciumphosphatgel eine Endreinigung der durch Gelfiltration über Sephadex G-200 gewonnenen PDC-Fraktionen zu erreichen.

Die ersten Versuche wurden mit einem nach Keilin und Hartree³⁰ selbst dargestellten Calciumphosphatgel unternommen. Weiter wurden auch Versuche mit nach Tiselius et al.²⁸ präparierten Gelen durchgeführt. Später stand dann das von der Firma BioRad, Richmond, California, angebotene Calciumphosphatgel-Fertigpräparat zur Verfügung.

Den selbst präparierten Gelen mußten zur Verbesserung der Durchflußeigenschaften Cellulose bzw. Celite 545 zugesetzt werden. Die Proteinlösung (ca. 20 - 30 mg) wurde mit einer Pipette direkt auf das Gel aufgebracht. Wegen der von Gel zu Gel unterschiedlichen, aber immer nur mäßigen Durchflußeigenschaften (3 bis 15 ml/h) wurde ausschließlich unter hydrostatischem Druck eluiert. Zur Elution wurden Phosphatpuffer-Gradienten (pH 6,8) unterschiedlicher Steilheit eingesetzt. Daneben wurden auch Versuche mit 0,05 M Phosphatpuffer, dem linear steigende Mengen von Ammoniumsulfat (bis 40%) zugesetzt worden waren, durchgeführt. Das Verfahren erwies sich besonders bei Einsatz der selbst hergestellten Gele als sehr schlecht reproduzierbar.

Beim Aufbringen der PDC in 0,05 M Phosphatpuffer blieb das Protein am Gel adsorbiert. Die Ablösung erfolgte bei steigenden Molaritäten, die aber nahezu bei jedem Versuch unterschiedlich hoch waren. In einigen Fällen konnte das Protein selbst mit 0,5 M Phosphatpuffer nicht abgelöst werden. Mit einem Ammoniumsulfat-Gradienten gelang das immer. Häufig zeigten sich im Schreiberbild mehrere Peaks, die sich bei der Untersuchung der entsprechenden Fraktionen in der SDS-PAGE allerdings als einheitlich erwiesen. Für die Interpretation solcher Artefakte gibt es mehrere Möglichkeiten. Die einfachste ist

sicher, daß unterschiedliche Durchflußeigenschaften bzw. Adsorptionscharakteristika des Gels in verschiedenen Bereichen des Gelbetts dafür verantwortlich sind. Diese könnten z.B. aus unzureichend homogener Mischung von Gel und Cellulose bzw. auch aus heterogenen Gelen resultieren. Daneben könnte auch ein unterschiedlicher Denaturierungsgrad des Proteins für eine Peak-Artefaktebildung verantwortlich sein. Für die Adsorption des Proteins an Calciumphosphat sind offensichtlich Carboxylgruppen²⁹ verantwortlich. In Abhängigkeit vom Denaturierungsgrad nimmt die Zahl der exponierten Carboxylgruppen des Proteins und damit die Affinität zum Calciumphosphat ab. Bei Stufen-Elution, wo dieses Phänomen auch leichter erklärlich ist, wurden solche Peak-Artefakte bereits beschrieben.²⁸ Neben Peak-Artefakten zeigten die Schreiberbilder auch häufig ein sehr ausgeprägtes "tailing", das bisher ebenfalls vorwiegend bei Stufen-Elution beobachtet wurde.²⁸ Einigermaßen befriedigende Ergebnisse im Hinblick auf die Reinigung der PDC konnten nur mit Gelen nach Tiselius²⁸ und hier, wegen der besseren Reproduzierbarkeit, vor allem mit den gekauften Fertigpräparaten der Firma BioRad erzielt werden. Am günstigsten erwies sich die Elution mit einem Phosphatpuffer-Gradienten von 0,05 bis 0,5 M (je 100 ml). Hierbei wurde im Optimalfall eine Auftrennung entsprechend Abb. 9 erzielt.

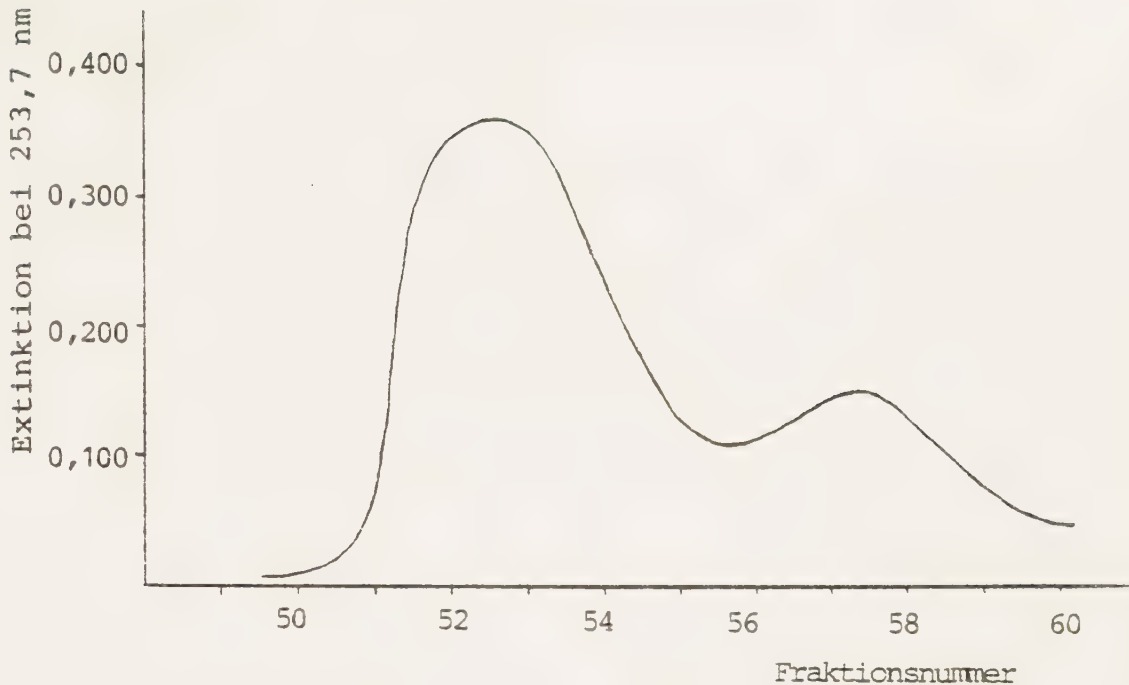


Abb. 9: Elutionsprofil einer Adsorptionschromatographie von PDC (nach Ullrich⁴ gereinigt) an Calciumphosphatgel (BioRad). Elution mit einem Na-Phosphatpuffergradienten (je 100 ml 0,05 M und 0,5 M Puffer). Säulenmaße: 30 x 1cm; Gelbetthöhe 15 cm; Elutionsgeschwindigkeit 5 ml/h; Fraktionsvolumen 3 ml.

Die Fraktionen 51 - 53 des ersten Peaks zeigten in der SDS-PAGE praktisch nur die PDC-Bande, während die folgenden Fraktionen die PDC-Bande in abnehmender und die üblicherweise in PDC-Präparaten anzutreffende zweite Komponente in steigender Intensität zeigten. Die im allgemeinen in den Fraktionen einer Sephadex G-200-Gelfiltration vorhandenen niedermolekularen Banden fehlten meist ganz, blieben also offensichtlich an Calciumphosphat adsorbiert. Die spezifische Aktivität der durch Chromatographie an Calciumphosphat gewonnenen besten PDC-Präparate lag allerdings bei nur 40% der aufgegebenen, nach Ullrich gewonnenen Präparate. Dies, sowie die schlechtere Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens, machten die Chromatographie der PDC-Präparate an Calciumphosphatgel als Endreinigungsschritt ungeeignet.

2.1.4. Gradientenelution der mit Ammoniumsulfat im Gel präzipitierten PDC.

Vorversuche, die durch Sephadex G-200 Gelfiltration gereinigte PDC durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung nachzureinigen, blieben erfolglos. Es wurde daraufhin versucht, das Verfahren in umgekehrter Weise als Gradienten-Elution der mit Ammoniumsulfat präzipitierten PDC durchzuführen.

Entsprechend den Arbeiten von King³¹ wurde zunächst Celite-545 als Trägermaterial eingesetzt.

Eine Ammoniumsulfatsuspension der PDC wurde jeweils mit der Pipette vorsichtig auf die Geloberfläche aufgebracht. Dann wurde mit einer 2-M Ammoniumsulfatlösung gespült, bevor fallende Gradienten von Ammoniumsulfatlösungen angelegt wurden.

Die Versuche brachten kein Ergebnis. Die PDC wurde jeweils als einheitlicher Peak eluiert. Der Verlust an spezifischer Aktivität der PDC lag bei 20%, der Protein-Verlust bei 30%. Letzterer wurde offensichtlich durch spurenweise Elution der PDC vor dem Hauptpeak verursacht. Die Verluste waren größer, wenn höhere Elutionsgeschwindigkeiten gewählt wurden. Die Versuche wurden anschließend modifiziert, entsprechend dem von Porath³² als Zonen-Präzipitation beschriebenen Verfahren, durchgeführt. Sephadex G-50 fine wurde als Trägermaterial eingesetzt, später wurden auch Versuche mit Sephadex G-75 und Sephadex G-100 unternommen. Auch diese Versuche brachten keinen Erfolg. Die PDC wurde jeweils als einheitlicher Peak bei erstaunlich niedriger Ammoniumsulfatkonzentration (ca. 0,5 Mol/l) eluiert. Die Protein- und Aktivitätsverluste lagen auch hier in der Größenordnung von 20 - 40%. Offensichtlich war bei dieser Art des Aufbringens der PDC auf die Säule das Präzipitat zu kompakt, so daß die Elution nicht entsprechend der Löslichkeit quantitativ erfolgte, sondern nur spurenweise entsprechend der Zugänglichkeit der präzipitierten PDC für die Elutionsflüssigkeit.

Es wurde deshalb für weitere Versuche Sepharose 6B, ein größerporiges Gel gewählt, um die Präzipitation in das Innere des Gels zu verlegen. Damit sollte erreicht werden, daß schon ein feines Präzipitat im Gel zurückgehalten wird, das dann der Elutionsflüssigkeit auch besser zugänglich ist. Die PDC wurde in 2 ml 0,05 M Na-Phosphatpufferlösung (60 mg Protein/ml Pufferlösung) über Adapter aufgebracht. Die im oberen Viertel des Gelbettes präzipitierte PDC wurde mit einem Ammoniumsulfat-Gradienten (2 M $\rightarrow$ 1 M) eluiert. Die ersten PDC-haltigen Fraktionen wurden bei einem Elutionsvolumen von ca. 500 ml, d.h. einer Ammoniumsulfatkonzentration von ca. 1,6 M eluiert.

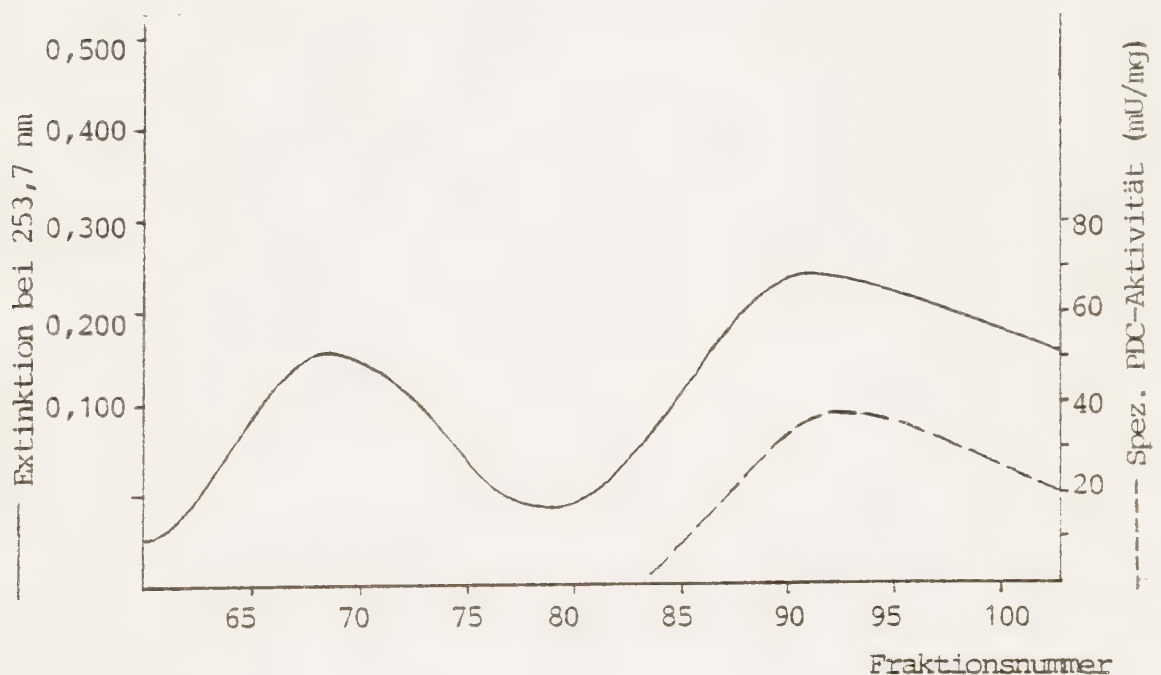


Abb. 10: Fraktionierte Ammoniumsulfatelution einer über Sepharose 6B vorgereinigten PDC. Säulenmaße 30 x 1,5 cm; Gelbetthöhe 20 cm; Elutionsgeschwindigkeit 30 ml/h; Gradient aus 680 ml 2-M und 740 ml 1-M Ammoniumsulfatlösung. Fraktionsvolumen 6 ml.
—— Extinktionsprofil bei 253,7nm;
----- Spezifische Aktivität der PDC (mU/mg);

Gewonnen wurden bei diesem Verfahren ca. 62 mg PDC mit einer spezifischen Aktivität von mehr als 20 mU/mg. Die Spitzenfraktion hatte eine spezifische Aktivität von 40 mU/mg.

Aufgebracht wurden 105 mg eines PDC-Pools, der durch Gelfiltration über Sepharose 6B vorgereinigt worden war. Die spezifische Aktivität des Pools lag bei 22 mU/mg, die Spitzenfraktion hatte eine spezifische Aktivität von 60 mU/mg.

In der SDS-PAGE zeigten die PDC-haltigen Fraktionen der Ammoniumsulfat-Elution eine erheblich bessere Reinheit als die Fraktionen der konventionellen Sepharose 6B Gelfiltration. Die in den Fraktionen der Sepharose 6B Gelfiltration üblichen Begleitbanden zeigten sich weitgehend in den Fraktionen 66 - 80 des Vorpeaks. Der Verlust von ca. 50% der PDC-Aktivität schränkte den Wert dieses Verfahrens zur Nachreinigung der PDC jedoch ein.

2.1.5. Halbpräparative PAGE

Die Versuche unter 1.1.3. hatten aufgezeigt, daß sich die halbpräparative PAGE prinzipiell zur Darstellung von reiner PDC eignet. Eine Übertragung des Verfahrens auf die präparative PAGE wurde nicht vorgenommen, da die in den Gelen eng an der PDC liegende Bande eines Begleitproteins bei der Elution keine scharfe Trennung erwarten ließ. Eben diese Begleitbande machte aber auch die Gewinnung reiner PDC in der halbpräparativen PAGE mühsam (vgl. 1.1.3.). Da zudem durch die schlecht zu kontrollierende Hitzeentwicklung in den Gelen starke Verluste an spezifischer Aktivität der PDC (40 bis 80%) festgestellt wurden, wurde auch dieses Verfahren zur Nachreinigung der PDC nicht weiterverfolgt.

2.2.0. Austausch der Sephadex G-200-Gelfiltration als Endreinigungsschritt der PDC-Darstellung durch andere Methoden.

2.2.1. Adsorption von PDC-Rohenzym an Alumina C_γ im Batch-Verfahren.

Neben dem Verfahren von Ullrich waren in der Literatur auch andere Methoden zur Darstellung der PDC beschrieben worden bzw. wurden im Verlaufe dieser Arbeiten beschrieben. So hatten Juni und Heym³³ ihre Untersuchungen an Bäckerhefe-PDC durchgeführt, die sie aus einem Extrakt von getrockneten Hefezellen gewonnen hatten, der zur Anreicherung einem Erhitzungsschritt (ca. 60°C) unterworfen worden war. Die Endreinigung erfolgte durch Adsorption der Begleitproteine an Alumina C_γ im Batch-Verfahren.

Diese Darstellungsmethode wurde entsprechend der Originalvorschrift nachgearbeitet. Die spezifischen Aktivitäten der gewonnenen PDC-Präparate lagen um 40 mU/mg, die Reinheitsprüfung mit der SDS-PAGE zeigte jedoch eine Vielzahl von Begleitproteinen. Auch der Versuch, Rohenzym, das nach Ullrich gewonnen worden war, durch Adsorption an Alumina C_γ von Begleitproteinen zu reinigen, brachte nur eine unwesentliche Verbesserung der Qualität des Rohenzyms. Das Verfahren von Juni und Heym³³ stellt demnach keine Alternative zur Reinigung der PDC nach Ullrich dar.

2.2.2. Chromatographie von PDC-Rohenzym an Calciumphosphatgel.

Versuche, PDC-Rohenzym entsprechend den Versuchsbedingungen von 2.1.3. durch Adsorptionschromatographie an Calciumphosphatgel der Fa. BioRad zu reinigen, blieben ohne Erfolg. Die PDC-Mengen, die dabei gewonnen wurden, reichten kaum für die Reinheitsprüfungen aus. Wurde mehr Rohenzym aufgegeben, verstopften die Säulen. Versuche mit größeren Säulen und größeren Gelvolumina wurden nicht unternommen, da nach allen bisherigen Versuchen kein brauchbares Resultat erwartet werden konnte.

2.2.3. DEAE-Cellulose Ionenaustauschchromatographie von PDC-Rohenzym

Gounaris et al.¹⁸ hatten die PDC aus Bäckerhefe isoliert, indem sie Rohenzym, das sie mit geringen Modifikationen entsprechend Ullrich⁴ gewonnen hatten, an DEAE-Cellulose chromatographierten. Ähnlich waren später auch Oba und Uritani³⁴ bei der Darstellung von PDC aus Süßkartoffeln vorgegangen.

Entsprechend Gounaris et al.¹⁸ wurde Rohenzym, das nach Ullrich gewonnen wurde, an DEAE-Cellulose chromatographiert.

Die Versuchsbedingungen entsprachen den von Gounaris angegebenen.

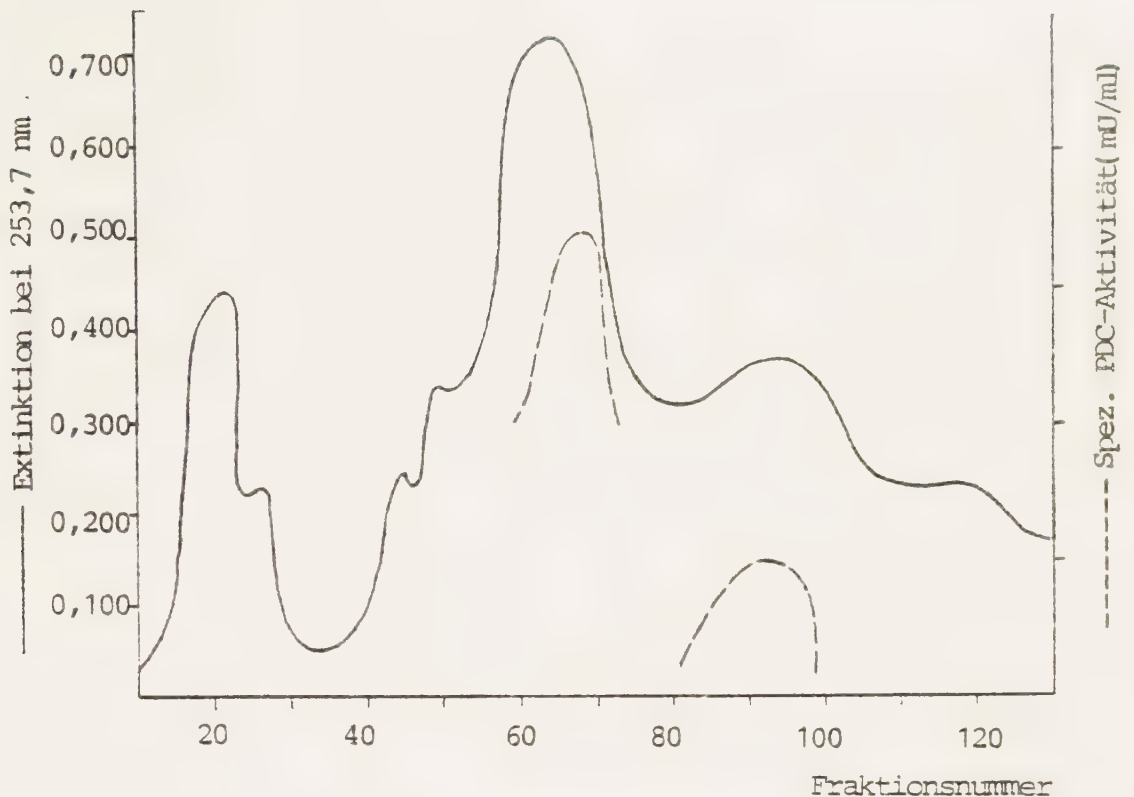


Abb. 11: Elutionsprofil der Chromatographie von Roh-PDC an DEAE-Cellulose entsprechend dem Verfahren von Gounaris et al.¹⁸. Säulenmaße 50 x 1 cm; Gelbetthöhe 30 cm; Elutionsgeschwindigkeit 20 ml/h; Fraktionsvolumen 3,5 ml.

———— Extinktion bei 253,7 nm
----- spezifische Aktivität der PDC in mU/mg.

Die Fraktionen 60 - 70, die die höchsten spezifischen PDC-Aktivitäten enthielten, wurden, wie bei Gounaris et al.¹⁸ beschrieben, rechromatographiert. Das Elutionsprofil zeigte nur einen Peak. Das gewonnene Präparat hatte eine spezifische Aktivität von ca. 25 mU/mg. Die Ausbeute lag bei 2 bis 3 % des eingesetzten Rohenzyms. Das Bild in der SDS-PAGE zeigte neben der PDC die übliche Zusatzbande sowie einige schwächere Banden. Die Nachreinigung der nach Gounaris et al.¹⁸ gewonnenen Fraktionen mittels einer Gelfiltration über

Sephadex G-200 zeigte Fraktionen, die in der Reinheit in etwa denen nach Ullrich gewonnenen entsprachen, allerdings betrug der Verlust an spezifischer Aktivität während der Gelfiltration bis zu 30%. Wie auch schon von Gounaris et al.¹⁸ angegeben, wurde neben dem Hauptpeak noch ein zweiter Enzymaktivitätsgipfel (hier F 82 - 95) gefunden. In der SDS-PAGE zeigten sich hier eine sehr schwache PDC-Bande und im übrigen breite, verschmierte Banden im Molekulargewichtsbereich um 10 000. Das Verfahren zur PDC-Darstellung nach Gounaris et al.¹⁸ zeigte sich jedenfalls, auch mit anschließendem zusätzlichen Gelfiltrationsschritt, im Hinblick auf Ausbeute und Qualität des Enzyms sowie im Hinblick auf Arbeitsaufwand dem von Ullrich angegebenen Verfahren deutlich unterlegen.

2.2.4. CM-Sephadex Ionenaustauschchromatographie von PDC-Rohenzym.

1974 gaben Ludewig und Schellenberger³⁵ ein Verfahren zur Isolierung von Bierhefe-PDC an, das nach den vorgelegten Daten den bisher eingesetzten Verfahren überlegen schien. Es war Enzym mit einer spezifischen Aktivität bis zu 85 mU/mg gewonnen worden. Die Fraktionen zeigten in der SDS-PAGE nur Spuren von Begleitproteinen, die durch eine Gelfiltration über Sephadex G-200 ebenfalls noch eliminiert werden konnten.

Ludewig und Schellenberger³⁵ chromatographierten Rohenzym, das entsprechend Ullrich⁴ gewonnen worden war, über CM-Sephadex C-50. Sie benützten zur Elution eine 0,05 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung, die mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH 5,18 oder mit konzentrierter Essigsäure auf pH 5,10 eingestellt worden war.

Die Wahl dieser Versuchsbedingungen überraschte aus verschiedenen Gründen. Die maximale Kapazität von CM-Sephadex C-50 liegt in einem pH-Bereich von 6 bis 10^{36} , während hier bei einem pH-Wert um 5 gearbeitet wurde. Weiter wurde (unter Startbedingungen) mit einem Puffer eluiert, dessen pH-Wert sehr eng am IEP der PDC liegt (vgl. 3.3.0.).

Entsprechend erfuhr die PDC bei der Ionenaustauschchromatographie auch nur eine geringe Durchflußverzögerung. Sie war etwas größer als die der zweiten, üblicherweise in PDC-Präparaten enthaltenen Komponente, deren IEP noch etwas näher an dem des Elutionspuffers liegt (vgl. 3.3.0.).

Die Versuche mit diesem Trennverfahren brachten, im Hinblick auf Elutionsbilder bei verschiedenen pH-Werten, spezifische Aktivität und Proteinausbeute, die von Ludewig und Schellenberger³⁵ angegebenen Ergebnisse.

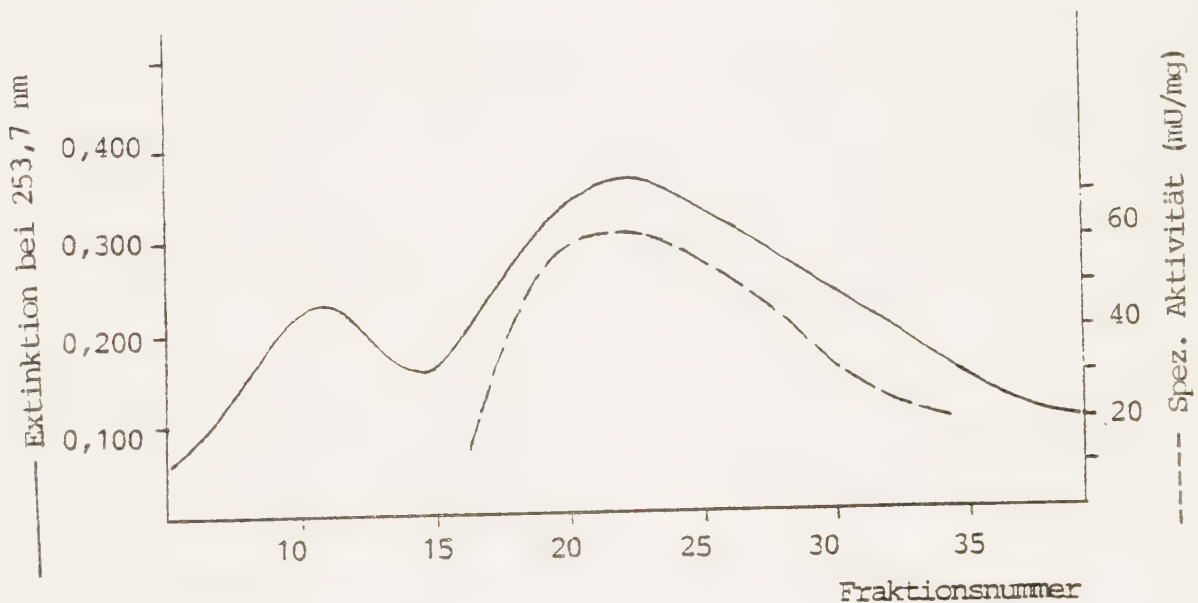


Abb. 12: Elutionsprofil der Chromatographie von Roh-PDC an CM-Sephadex C-50 entsprechend dem Verfahren von Ludewig und Schellenberger³⁵. Säulenmaße 50 x 1 cm; Gelbetthöhe 20 cm, Elutionspuffer Dinatriumhydrogenphosphat/Essigsäure, pH 5,15. Elutionsgeschwindigkeit 30 ml/h. Fraktionsvolumen ca. 3 ml.
----- spezifische PDC-Aktivität.
———— Extinktion bei 253,7 nm.

Die Reinheit der PDC, wie sie sich in der SDS-PAGE darstellte, blieb unbefriedigend. Alle Präparate enthielten das übliche Begleitprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 48.000. Auch hier überraschte die schlechte Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Bei einigen Trennungen wurde in den Fraktionen ab 25 (vgl. Abb. 13) PDC gewonnen, die nur durch ca. 10% Begleitprotein vom Molekulargewicht 48000 verunreinigt war, aber die Ausbeute in diesen Fraktionen lag unter 0,5 mg/ml Protein. Bei den meisten Präparaten fanden sich allerdings noch breite, verschmierte Banden mit einem Molekulargewicht von 8000 bis 10000. Völlig unerklärlich war zu diesem Zeitpunkt die Beobachtung, daß häufig bei Trennungen nach Ludewig und Schellenberger³⁵ bei der Analyse der Fraktionen in der SDS-PAGE, auch in Fraktionen mit hoher spezifischer Aktivität, überhaupt keine PDC-Bande gefunden werden konnte, sondern nur Protein-Komponenten mit einem Molekulargewicht von 8 000 bis 10 000. Auch eine von Schellenberger freundlicherweise zur Verfügung gestellte Probe des von ihm dargestellten Reinenzyms zeigte dasselbe Phänomen.

Bei der CM-Sephadex Ionenaustausch-Chromatographie verblieb im oberen Teil der Säule jeweils ein gelber Ring, der ein ionenaustauschergebundenes, flavinhaltiges Protein anzeigte.

Dieses Protein konnte mit 0,05 M Phosphatpuffer von pH 6,8 von der Säule gewaschen werden. Im Schreiberbild zeigte sich ein Peak mit einer kleinen Vorschulter. In der SDS-PAGE ergaben die Fraktionen dieses Peaks eine breite Bande im Molekulargewichtsbereich von 8000 bis 12000. PDC-Aktivität konnte nicht

festgestellt werden. Nach erneuter Äquilibrierung mit dem Startpuffer waren die Säulen wieder einsatzbereit. Nach mehrmaliger Benutzung zeigten sich in dem oberen Bereich der Säule Ablagerungen von offensichtlich denaturiertem Protein, das sich nicht mehr von der Säule waschen ließ.

In einigen Fällen wurde der gelbe Proteinring weitgehend auch ohne Pufferwechsel mit deutlicher Verzögerung eluiert. In diesen Fällen konnte in den Fraktionen dieses Peaks auch immer PDC-Aktivität (bis 40 mU/mg) nachgewiesen werden. Auch hier dominierte in der SDS-PAGE eine breite, verschmierte Bande im Molekulargewichtsbereich von 8000 bis 10000. Daneben fanden sich noch einige höhermolekulare Banden, aber keine PDC-Bande. Eine plausible Erklärung für die oben aufgeführten Ergebnisse der Reinigung nach Ludewig und Schellenberger³⁵ war erst später möglich (vgl. 2.3.4.).

2.2.5. Gradientenelution von mit Ammoniumsulfat im Gel präzipitiertem PDC-Rohenzym.

Die unter 2.1.4. beschriebenen Versuche zur Zonenpräzipitation der nach Ullrich dargestellten gereinigten PDC wurden auch mit nach Ullrich dargestelltem PDC-Rohenzym durchgeführt. Dazu wurde eine mit Sepharose-6B gefüllte Säule der Maße 75 x 2 cm, Gelbetthöhe 20 cm, benutzt. Die Säule war 8 Stunden mit 2 M Ammoniumsulfatlösung gespült worden. Es wurden 1,5 g Rohenzympaste in 2 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8 über Adapter aufgebracht. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten aus 680 ml 2 M Ammoniumsulfatlösung und 740 ml 1 M Ammoniumsulfatlösung eluiert.

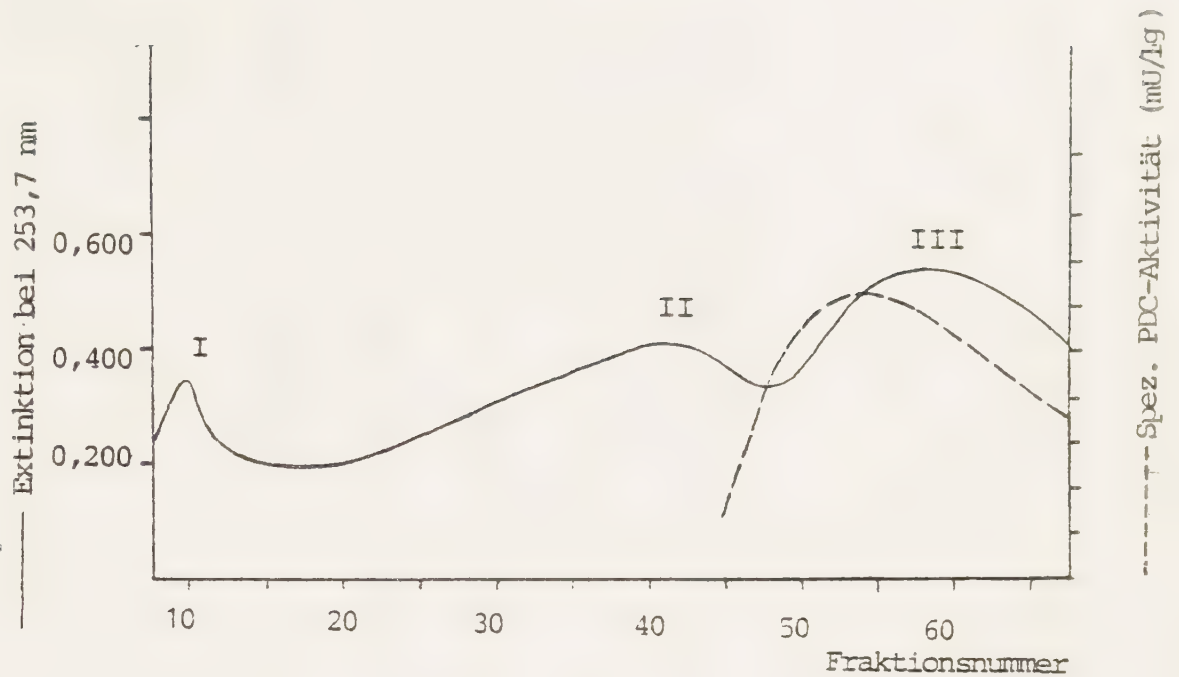


Abb. 13: Profil einer Gradienten-Elution von mit Ammoniumsulfat im Gel präzipitierter Roh-PDC von einer mit Sepharose-6B gefüllten Säule. Säulenmaße: 75 x 2 cm; Gelbett-höhe 20 cm. Gradient 680 ml 2 M und 740 ml 1 M Ammoniumsulfatlösung; Elutionsgeschwindigkeit 30 ml/h; Fraktionsvolumen 6 ml.

———— Extinktion bei 253,7 nm.
----- spezifische Aktivität der PDC (mU/mg).

Peak I und II enthielten keinerlei PDC-Enzymaktivität. Peak III enthielt spezifische PDC-Aktivität bis zu 60 mU/mg. Insgesamt wurden 130 bis 150 mg Protein mit PDC-Aktivität gefunden. In der SDS-PAGE zeigten einzelne Fraktionen aus den 3 Peaks folgendes Bild:

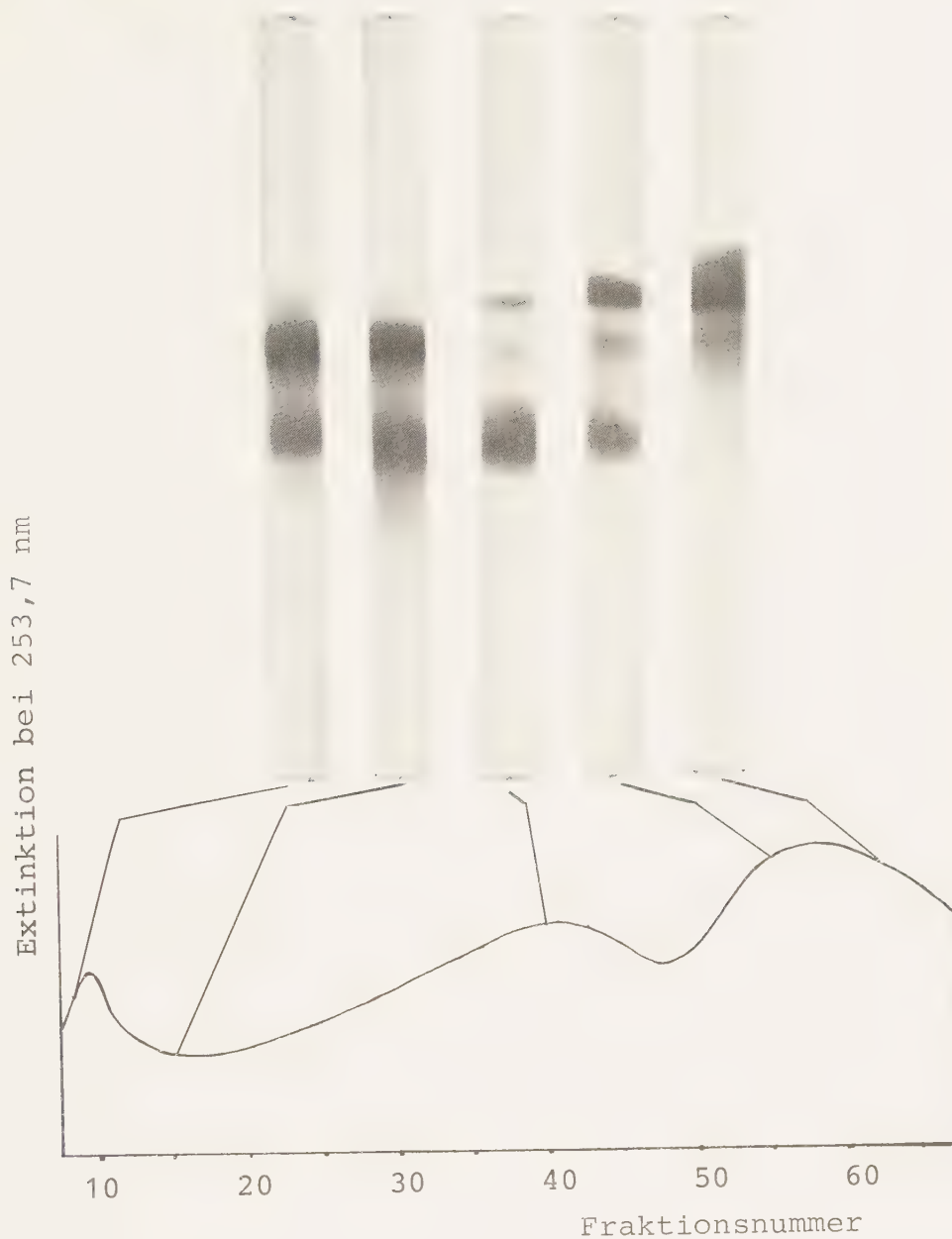


Abb.14: Profil einer Gradienten-Elution von PDC-Rohenzym entsprechend Abb. 13.
Die Proteinzusammensetzung der einzelnen Peaks ist in den abgebildeten Gelen einer SDS-PAGE nach Weber und Osborn¹⁶ sichtbar.

Das Verfahren brachte eine recht gute Auftrennung der 3 im wesentlichen in Roh-PDC enthaltenen Komponenten. Allerdings war auch hiermit keine hochreine PDC zu gewinnen, wie die Auswertung der SDS-PAGE ergab. Das Verfahren bietet sich jedoch als gut reproduzierbarer Vortrennungsschritt an.

2.3.0. Versuche zur Reduktion proteolytischer Aktivität in den PDC-Präparaten.

Die Versuche zur Verbesserung der Reindarstellung der PDC hatten keine befriedigenden Ergebnisse gebracht. In der zur Reinheitsprüfung der untersuchten PDC-Präparate verwendeten SDS-PAGE zeigten sich fast immer Begleitproteine. Die gleiche Beobachtung wurde bei der Auswertung von IFPAGs gemacht. In einigen Fällen war, vor allem bei den nach Schellenberger gewonnenen Enzympräparaten, trotz hoher spezifischer PDC-Aktivität keine PDC-Bande mehr gefunden worden. Statt dessen wurde eine Vielzahl von Banden mit niedrigerem Molekulargewicht beobachtet, die besonders in einem Molekulargewichtsbereich um 8000 zu einer breiten Bande verschmierten. In der IFPAG war ebenfalls die Bande im Bereich um pH 5,3 verschwunden, die in früheren Versuchen als PDC-Bande identifiziert worden war, zugunsten von Banden, die in dem pH-Bereich um 5,5 bis 6 lagen. Die Stabilität aller gewonnenen PDC-Präparate erwies sich als unzulänglich.

Bis jetzt hatte keiner der zahlreichen Autoren, die sich mit der Bierhefe-PDC beschäftigten, über Proteasen in den nach Ullrich gereinigten Präparaten berichtet (vgl. jedoch S. 41 oben). Deshalb wurde hier erst spät die Aktivität von proteolytischen Enzymen in die Überlegungen einbezogen.

Seit Dernby³⁷ 1917 die Gegenwart von intrazellulären Proteasen in Hefe-Autolysaten nachgewiesen hatte, haben sich viele Arbeitsgruppen mit den Proteasen in der Hefe und ihren natürlichen Inhibitoren beschäftigt. Drei Proteasen, die als Typ A, B und C bezeichnet werden, sind heute bereits relativ genau charakterisiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den bis 1974 dazu erschienenen Publikationen findet sich bei Pringle³⁸.

Juni und Heym hatten 1968 Proteasen in ihren PDC-Präparaten aus Bäckerhefe nachgewiesen³⁹. Sie beobachteten dabei, daß der Einfluß der proteolytischen Aktivität sowohl zur Inaktivierung, wie auch zur Modifikation der PDC führen kann, wobei sich letztere durch eine Veränderung des Verhältnisses zweier katalytischer Aktivitäten der PDC äußerte. Das von Juni und Heym zur Darstellung der PDC eingesetzte Verfahren³³, das im wesentlichen aus einem Erhitzungsschritt eines Extraktes aus Hefezellen und Abzentrifugieren des denaturierten Eiweißes, sowie einer anschließenden Ammoniumsulfatfällung und einer Adsorption von Begleitproteinen an Alumina C γ besteht, lieferte, wie eigene Versuche zeigten, (vgl. B 2.2.1.) allerdings nur Rohpräparate. Untersuchungen an Bierhefe-PDC waren bisher nicht bekannt geworden. Nach den Ergebnissen von Juni und Heym³⁹ waren die für Bäckerhefe gültigen Befunde nicht ohne weiteres auf die Bierhefe übertragbar, da schon verschiedene Stämme der Bäckerhefe unterschiedliche Verhältnisse zeigten. Auch Untersuchungen an Bäckerhefe-PDC größerer Reinheit, wie sie z.B. nach den Verfahren von Gounaris et al.¹⁸, Ullrich⁴ oder Ludewig und Schellenberger³³ gewonnen werden kann, waren bisher nicht vorgenommen worden.

2.3.1. Untersuchung der Proteasenaktivität in PDC-Präparaten

Die Untersuchungen zur Abklärung der Proteasenaktivität wurden an verschiedenen Rohenzympräparaten sowie Reinenzympräparaten, die nach Ullrich⁴ bzw. Ludewig und Schellenberger³⁵ dargestellt worden waren, durchgeführt.

Für die Aktivitätsbestimmungen der Proteasen A, B und C wurden die von Juni und Heym³⁹ angegebenen Verfahren benutzt. Bei den Protease-A Tests diente säuredenaturiertes Hämoglobin, bei den Protease-B-Tests Azocoll als Substrat. Die Protease-C-Aktivität wurde mit N-cbz-L-alanyl-L-phenylalanin als Substrat bestimmt.

Als Maß für die Proteasen-Aktivität dienten jeweils die nach 30 Minuten Inkubationszeit gemessenen Extinktionen nach Abzug von Leerwerten bezogen auf 1 mg Protein.

Grundsätzlich bleibt natürlich bei allen Protease-Tests die Frage, ob und wie weit unter den Testbedingungen Proteasen aktiviert, d.h. Protease/Proteaseinhibitor-Komplexe gespalten werden.

Möglicherweise sind die Tests deshalb als Maßstab für aktive Proteasen nur bedingt geeignet.

	Protease A E ₂₈₀ /mg	Protease B E ₅₄₆ /mg	Protease C E ₅₇₈ /mg
Rohenzym 1	0,350	0,100	0,228
Rohenzym 2	0,330	0,090	0,160
Rohenzym 3	0,120	0,060	0,070
Gereinigtes Enzym nach Schellenberger ¹	0,500	0,110	15,100*
Gereinigtes Enzym n. Schellenberger 2	0,000	0,239	24,100*
Gereinigtes Enzym nach Ullrich 1	0,060	0,020	6,600*
Gereinigtes Enzym nach Ullrich 2	0,063	0,131	13,300*

*Die Protease-C-Aktivität wurde in einer 1:50 Verdünnung gemessen.

Tabelle 5: Proteasenaktivität (Extinktion nach 30 Minuten/mg) in PDC-Präparaten nach Abzug von Leerwerten (Verfahren nach Juni und Heym³⁹).

Die angegebenen Werte stellen Beispiele aus einer großen Zahl von Einzelmessungen dar. Repräsentative Mittelwerte können nicht angegeben werden, weil die Einzelwerte von Charge zu Charge sehr unterschiedlich waren. Folgende generelle Aussagen können jedoch im Hinblick auf die Proteasen-Aktivität gemacht werden:

Alle untersuchten, gereinigten PDC-Präparate zeigen, ebenso wie alle eingesetzten PDC-Rohenzym-Präparate, Aktivitäten der Proteasen A, B, C in unterschiedlichem Ausmaß. Bei den nach Ludewig und Schellenberger³⁵ gewonnenen Präparaten liegen die Aktivitäten der Proteasen B und C im Durchschnitt erheblich höher als bei den nach Ullrich⁴ gewonnenen. Protease A zeigt keine systematischen Unterschiede in den verschiedenen Präparaten.

Bei allen gereinigten Präparaten liegen die spezifischen Protease-C Aktivitäten erheblich höher als in den entsprechenden Rohenzym-Präparaten. Bei den nach Ludewig und Schellenberger³⁵ gereinigten Präparaten fallen besonders hohe Probenleerwerte bei der Bestimmung der Protease-C auf, die auf einen hohen Gehalt an freien NH_2 -Gruppen bzw. eben Aminosäuren deuten, die durch die Aktivität der als Carboxypeptidase beschriebenen Protease-C entstanden sein dürften⁴⁰.

Da bekannt ist, daß sowohl Protease B wie Protease C durch Inkubation bei pH 5 aktiviert werden⁴¹, läßt sich der Gehalt an aktiven Proteasen in den Präparaten nach Schellenberger erklären, da bei dem Verfahren nach Ludewig und Schellenberger die PDC längere Zeit bei pH 5,1 gehalten wird. Wird Rohenzym vergleichsweise ebenso lange wie bei dem Reinigungsverfahren nach Schellenberger bei pH 5,1 (5°C) inkubiert, steigt die Aktivität der Proteasen B und C um das 2 - 5fache. Wird das gleiche Rohenzym über CM-Sephadex C-50 chromatographiert, ist die Aktivität der Proteasen-B und-C stets noch höher als nach der Inkubation bei pH 5.1.

Es wird durch die Ionenaustauschchromatographie also vermutlich zusätzlich eine Anreicherung aktiver Proteasen B und C bewirkt. Das kann darauf beruhen, daß diese Proteasen bei den angewendeten Versuchsbedingungen sich wie PDC verhalten oder, daß sie durch Adsorption an PDC mit der PDC eluiert werden. Zusätzlich muß noch daran gedacht werden, daß eventuell Inhibitoren dieser Proteasen bei den Versuchsbedingungen adsorbiert werden, was zu einer zusätzlichen Aktivierung durch Freisetzung von Proteasen aus Protease/Proteaseinhibitor-Komplexen führen kann. Die im Vergleich zum eingesetzten Rohenzym sehr hohen Protease-A, Protease-B und Protease-C-Aktivitäten in den Fraktionen von Sephadex G-200 und Sepharose 6B Gelfiltrationen können ähnlich erklärt werden. Die Proteasen werden durch den Gelfiltrationsschritt offensichtlich nicht befriedigend abgetrennt, obwohl für sie jeweils Molekulargewichte von unter 100.000 angegeben werden³⁸.

Juni und Heym³⁹ nahmen an, daß durch die Gelfiltration niedermolekulare Proteaseinhibitoren abgetrennt werden, was zu einer Aktivierung von Proteasen führt. Eine im Verlauf dieser Versuche gemachte Beobachtung konnte diese Hypothese zumindest für Protease-A stützen. Rohenzym, in dem keine Protease-A-Aktivität gefunden wurde, war über Sepharose-6B filtriert worden. In den PDC-haltigen Fraktionen der Filtration fand sich Protease-A-Aktivität bis $E_{280}/\text{mg} = 0,100$ (30 Minuten Inkubationszeit). Natürlich besteht auch hier die Möglichkeit, daß die Proteasen durch Adsorption an die PDC in die durch Gelfiltration erhaltenen, gereinigten Enzympräparate gelangen. Dafür sprach folgender Versuch:

In den durch eine Gelfiltration von Rohenzym über Sepharose 6B erhaltenen Fraktionen wurden die spezifischen Proteasenaktivitäten untersucht. Das Elutionsvolumen der Protease C war immer völlig identisch mit

dem der PDC, die Elutionsvolumina der Proteasen-A und -B waren jeweils nur wenig größer als das der PDC.

Das Vorhandensein von aktiven bzw. aktivierbaren Proteasen in den gereinigten PDC-Präparaten erklärt eine Reihe von Phänomenen, die von verschiedenen Untersuchern gefunden wurden:

So können einmal die sehr unterschiedlichen Berichte über die Stabilität der gereinigten PDC mit unterschiedlich hohem Gehalt an aktiven bzw. aktivierbaren Proteasen erklärt werden. Wegen dieser stark von Batch zu Batch unterschiedlichen Stabilität hatte ja beispielsweise Boehringer-Mannheim vor einiger Zeit die bis dahin angebotenen "PDC-Reinenzympräparate" aus dem Handel genommen und bis heute nicht wieder eingeführt.²⁶

Weiter erklärt das Vorhandensein von durch Proteolyse entstandenen Bruchstücken der PDC bzw. von durch Proteolyse modifizierter PDC die unterschiedlichen Angaben über den IEP der PDC³⁵. In den hier durchgeführten Versuchen hatte sich gezeigt, daß die niedermolekularen Begleitproteine, bei denen es sich nach den hier vorgelegten Ergebnissen weitgehend um durch Proteolyse entstandene Spaltpeptide handeln dürfte, IEPs zwischen 5,5 und 6 zeigen, während der IEP der PDC zu 5,3 bestimmt wurde (vgl. B 3.3.0.) Ludewig und Schellenberger³⁵ hatten den IEP bei ihren Präparaten zu pH 5,8 bestimmt. Wie jedoch bereits geschildert, enthielten ihre Präparate bei den hier durchgeführten Versuchen immer sehr hohe Proteasenaktivitäten und, damit zusammenhängend, einen hohen Anteil von Spaltpeptiden. Es war in diesem Zusammenhang aufgefallen, daß das Bild in der IFPAG besonders dann sehr heterogen war, wenn die Proben durch Dialyse und nicht durch Sephadex G-25-Gelfiltration entsalzt wurden. Offensichtlich ist der größere Abbaugrad eine Folge der bei der Dialyse erheblich längeren Zeit, die das Protein ungeschützt der Aktivität proteolytischer Enzyme ausgesetzt ist.

Entsprechend kann auch das Auftreten verschiedener Peaks mit PDC-Aktivität bei der Ionenaustausch-chromatographie von Rohenzym mit CM-Sephadex C-50³⁵ sowie mit DEAE-Cellulose¹⁸ erklärt werden. In diesem Fall könnten sowohl durch Proteolyse modifizierte PDC-Anteile als auch durch Proteolyse entstandene PCD-Bruchstücke mit enzymatischer Aktivität für die zusätzlichen Peaks verantwortlich sein.

Es lag nun natürlich auch nahe, die sehr unterschiedlichen Angaben über das Molekulargewicht der PDC^{6,18,42,43,44,45} mit einem unterschiedlichen Abbaugrad des Enzyms infolge Proteolyse zu erklären, wobei ebenfalls angenommen werden müßte, daß auch noch Bruchstücke der PDC enzymatische Aktivität zeigen. In eigenen Versuchen war das Molekulargewicht der PDC durch Gelfiltration über Sepharose 6B zu ca. 240.000 bestimmt worden (vgl. B 3.1.2.). Es zeigten sich aber, besonders wenn zur Molekulargewichtsbestimmung sehr alte PDC-Präparate eingesetzt worden waren, auch einige "Ausreißer" für die ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 160 - 180.000 gefunden wurde. Diese Beobachtung konnte natürlich nicht mehr mit der, sicher großen, Streubreite des eingesetzten Verfahrens (Gelfiltration) erklärt werden. Weiter war auch beobachtet worden, daß manche nach Ludewig und Schellenberger³⁵ dargestellten Präparate von hoher spezifischer Aktivität in der SDS-PAGE keine PDC-Bande, sondern nur verschmierte Banden in einem Molekulargewichtsbereich um 8.000 zeigten, was ebenso für Bruchstücke mit enzymatischer Aktivität spricht. Zur Klärung wurde ein nach Ullrich gewonnenes PDC-Präparat, dessen PDC-Bande in der SDS-PAGE mehr als 70% des gesamten Proteingehaltes enthielt und dessen spezifische Aktivität bei 45 mU/mg lag, über Sepharose 6B filtriert und das Elutionsvolumen festgestellt. Daraufhin wurde ein nach Ludewig und Schellenberger³⁵ gewonnenes PDC-Präparat, das in der SDS-PAGE keine PDC-Bande mehr zeigte, aber im Enzymtest eine spezifische Aktivität von 58 mU/mg

aufwies auf dieselbe Säule aufgebracht und ebenfalls das Elutionsvolumen bestimmt. Der Vergleich der Elutionsvolumina zeigte keinen Unterschied, obwohl die PDC-haltigen Fraktionen der Filtration des nach Schellenberger gewonnenen Präparates in der SDS-PAGE das gleiche Bild zeigten, wie der auf die Säule aufgebrachte PDC-Pool. Das könnte darauf hin deuten, daß zwar die Tertiärstruktur der PDC erhalten geblieben ist, aber die Untereinheiten durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme bereits mehrere Bruchstellen zeigen. Bei der Denaturierung in SDS zerfallen dann die Untereinheiten, entsprechend den Bruchstellen, in Bruchstücke mit niedrigerem Molekulargewicht. Damit bleibt weiter offen, wie die unterschiedlichen, teilweise sehr stark divergierenden, Angaben über das Molekulargewicht der PDC erklärt werden können.

2.3.2. Eignung der SDS-PAGE zur Reinheitsprüfung von Proteinen in Gegenwart von Proteasen.

Bisher wurde die SDS-PAGE zur Reinheitsprüfung für alle gewonnenen Enzympräparate eingesetzt. Da seit längerem bekannt ist, daß Proteasen durch die Einwirkung verschiedener Denaturierungsmittel aktiviert werden können^{46,47,48,49}, mußte abgeklärt werden, ob die Aussagefähigkeit dieses Verfahrens evtl. durch die Proteasenaktivität beeinträchtigt wird.

In der Literatur werden verschiedene Ursachen für die Aktivierung von Proteasen durch Denaturierungsmittel aufgezeigt. Einmal sind native Proteine in einem gewissen Maße resistent gegenüber dem Angriff von Proteasen. Diese Resistenz geht verloren, wenn eine Denaturierung eintritt. Da einige Proteasen offensichtlich erheblich weniger leicht denaturiert und damit inaktiviert werden können als die Proteine, die ihnen als Substrat dienen, führt die Denaturierung häufig zu gesteigerter Proteolyse. Weiter ist für einige Proteasen nachgewiesen, daß Denaturierungsmittel

direkt zu einer Aktivierung der Proteasen führen, weil dadurch Protease/Proteaseinhibitor-Komplexe zerstört und aktive Proteasen freigesetzt werden. Eine ausführliche Übersicht über die bis etwa 1974 publizierten Untersuchungen zu diesen Beobachtungen findet sich bei Pringle.³⁸

Zur Abklärung dieses Problems wurde PDC unter den für die Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE üblichen Bedingungen denaturiert. Dazu wurde die PDC in einer Konzentration von 1mg/ml 2 Stunden bei 37°C in einer 1%igen Lösung von SDS in einer 0,5 M Phosphatpufferlösung von pH 6,8 gehalten. Untersucht wurden sowohl Präparate, die nach Ludewig und Schellenberger³⁵, wie auch Präparate, die nach Ullrich⁴ dargestellt worden waren. Anschließend wurde die Proteasenaktivität der mit SDS behandelten Proben sowie der unbehandelten Proben vergleichsweise bestimmt.

Präparat	Spez. Akti- vität mU/mg	Spez. Proteasenaktivität (30 Minuten Inkubationszeit)					
		A		B		C	
		E ₂₈₀ /mg unbeh.	mit SDS denat.	E ₅₄₆ /mg unbeh.	mit SDS denat.	E ₅₇₈ /mg unbeh.	mit SDS denat.
Nach Ullrich gereinigte PDC 1	31	0,063	1,04	0,131	0,389	13,300*	0,561
Nach Ullrich gereinigte PDC 2	42	0,083	0,364	0,017	0,264	6,600*	0,373
Nach Schellen- berger gerei- nigte PDC 1	49	0	0	0,239	0,490	24,800*	0,800
Nach Schellen- berger gerei- nigte PDC 2	41	0,108	1,34	0,320	0,900	17,400*	0,700

*wurde in einer 1:50 Verdünnung gemessen.

Tabelle 6: Steigerung der Aktivität von Protease A und B und Reduzierung der Aktivität von Protease C in PDC-Präparaten nach Denaturierung mit 1%iger SDS-Lösung bei 37°C über 2 Stunden.

Nach zwei Stunden Denaturierung in SDS fanden sich noch etwa 5% der ursprünglichen Aktivität der Protease-C. Die Aktivitäten der Proteasen A und B wurden erheblich gesteigert, wobei der Effekt auf Protease A sogar noch größer war als der auf Protease-B.

Selbst nach 4 Stunden Inkubation in 1%iger SDS-Lösung bei Raumtemperatur zeigten sich noch sehr hohe Aktivitäten der Proteasen A und B, die in etwa jeweils noch 50% der nach 2 Stunden gemessenen betrug. Damit ist gezeigt, daß die gesteigerte Wirksamkeit der Proteasen während der SDS-Denaturierung der PDC zumindest teilweise auf einer Aktivierung der Proteasen A und B durch SDS beruht und nicht nur auf der leichteren Angreifbarkeit des denaturierten Substrats, also der PDC.

Nach diesen Versuchen muß davon ausgegangen werden, daß ein Teil der in der SDS-PAGE gefundenen Begleitproteine proteolytische Artefakte waren, die erst bei der SDS-Denaturierung entstanden waren.

Die Wirkung der proteolytischen Aktivität während der Denaturierung von PDC in 1%iger SDS-Lösung konnte durch folgenden Versuch sehr eindrucksvoll gezeigt werden:

Jeweils gleiche Mengen einer Ammoniumsulfatspuspension eines PDC-Präparates nach Ludewig und Schellenberger³⁵ wurden in Eppendorf-Mikrogefäße gebracht und das Enzym abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Abheben der Ammoniumsulfatlösung mit einer Eppendorf-Mikropipette wurde Probe a mit 1 ml auf 96°C erhitzter 1%iger SDS-Lösung versetzt und 2 Stunden bei 96°C gehalten. Die Proben B, C, D und E wurden ebenfalls mit 1%iger SDS-Pufferlösung versetzt und bei 37°C gehalten. Nach 30 Min. wurde Probe B, nach 60 Min. Probe C ebenfalls auf 96°C erhitzt und bis zum Ablauf von 2 Stunden bei dieser Temperatur gehalten. Probe D verblieb bei 37°C. Nach 2 Stunden wurden die Proben wie üblich bei

Raumtemperatur gegen eine 0,1%ige SDS-Pufferlösung dialysiert und in eine SDS-PAGE nach Weber und Osborn¹⁶ eingebracht.

Nach Färben und Entfärben wie üblich zeigte sich folgendes Bild:



Abb. 15: Wirkung von proteolytischen Enzymen auf PDC-Präparate bei Denaturierung in 1% SDS-Lösung.

- A. PDC, nach Schellenberger dargestellt, mit starker Begleitbande und hohem Gehalt an Proteasen A, B und C. Denaturiert 120 Min. bei 96°C.
- B. Wie A jedoch zunächst 30 Min. bei 37°C, dann 90 Min. bei 96°C denaturiert.
- C. Wie A jedoch zunächst 60 Min. bei 37°C, dann 60 Min. bei 96°C denaturiert.
- D. Wie A jedoch 120 Min. bei 37°C denaturiert.

In den Versuchen zeigte sich einerseits, daß die Aktivitäten der 3 untersuchten Proteasen beim Erhitzen auf 96°C in 1%iger SDS-Pufferlösung schon nach wenigen Minuten völlig verschwunden sind und andererseits, daß die bei der Denaturierung entstehenden Untereinheiten der PDC auch beim Erhitzen auf 96°C über 2 Stunden stabil bleiben. Es wurde deshalb im folgenden die Denaturierung der Proben für die SDS-PAGE grundsätzlich durch Inkubation der

PDC in SDS über mindestens 30 Minuten bei 96°C durchgeführt.

Leider, und das wurde durch weitere Untersuchungen von verschiedenen PDC-Präparaten mit Hilfe der SDS-PAGE bestätigt, ergab die Denaturierung bei 96°C kein dramatisch neues Bild von der Reinheit der dargestellten Enzympräparate. Im Optimalfall waren die üblichen zwei Banden zu finden, häufig zeigten sich noch schwächere Banden von Begleitproteinen (Spaltpeptiden). Letztere waren bei den nach Ludewig und Schellenberger³⁵ dargestellten Präparaten immer vorhanden und bildeten mindestens 50% des Gesamtproteinanteils. In keinem der untersuchten Fälle nahm während der Proteolyse die Intensität der 2. Bande, deren Molekulargewicht zu ca. 48.000 bestimmt worden war, zu. Es muß also weiterhin davon ausgegangen werden, daß es sich bei dieser Bande um ein Begleitprotein und nicht um ein durch Proteolyse entstandenes Abbauprodukt der PDC handelt. In allen im Vergleich untersuchten Fällen war jedenfalls der Anteil der Spaltprodukte, sowohl was die Zahl, als auch was die Intensität der Begleitbanden betraf, nach SDS-Denaturierung bei 96°C erheblich niedriger, als bei der bei 37°C durchgeführten SDS-Denaturierung. Eine Revision der im vorhergehenden wiedergegebenen Beobachtungen zur Reinheit der PDC und der gemachten Interpretationsversuche war aber nicht erforderlich.

2.3.3. Antiproteolytische Maßnahmen bei der PDC-Darstellung.

Die im vorhergehenden dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Proteasen auch das native Enzym schon während der Präparation angreifen. Es wurden deshalb im folgenden verschiedene antiproteolytische Maßnahmen bei

der Reinigung der PDC eingesetzt und auf ihre Effizienz untersucht. Es wurde dabei auch nach Maßnahmen zum Schutz der PDC während der Präparation gesucht, auch wenn letztes Ziel natürlich die totale Abtrennung bzw. die irreversible Inaktivierung der Proteasen sein mußte. Maßnahmen zur Bildung bzw. Stabilisierung von reversiblen Protease/Proteaseinhibitor-Komplexen sind sicher auf Vorreinigungsstufen sinnvoll, um das darzustellende Enzym vor Proteolyse zu bewahren. Sind diese Komplexe auch nach der Endreinigung vorhanden, besteht die Gefahr, daß sie bei folgenden Untersuchungen am Enzym aktiviert werden und erneut Störeffekte verursachen.

Zugabe von Hefekochsaft.

Die einfachste Möglichkeit, die Bildung von Protease/Proteaseinhibitor-Komplexen zu fördern, um das Enzym während der Anreicherung zu schützen, ist die Zugabe von Hefekochsaft, der ja bekanntlich reich an natürlichen Inhibitoren der Proteasen A und B ist.³⁸

Es wurde deshalb versuchsweise Hefekochsaft zum Mazerationssaft aus Brauereihefe gerührt und der Mazerationssaft dann wie üblich aufgearbeitet. Das so gewonnene Rohenzym unterschied sich von vergleichsweise ohne Hefekochsaftzusatz gewonnenem weder in Qualität (spezifische Aktivität), noch in der Proteasenaktivität signifikant, vermutlich, weil die möglicherweise gebildeten Protease/Proteaseinhibitor-Komplexe während der Anreicherung doch wieder weitgehend gespalten wurden.

PH-Wahl

Eine einfache Methode, um die Aktivierung von Protease/Proteaseinhibitor-Komplexen zu vermeiden, ist das Arbeiten in einem pH-Bereich um 7,0³⁸. Diese Voraus-

setzung ist bei der PDC-Darstellung nach Ullrich⁴ gegeben, nicht aber bei der Methode nach Ludewig und Schellenberger³⁵, was, wie gezeigt wurde, Konsequenzen im Hinblick auf die Proteasenaktivität hat.

Inaktivierung durch Erhitzen.

Juni und Heym³³ erhitzen während ihres Reinigungsverfahrens von PDC aus Bäckerhefe den Rohextrakt über 30 Min. auf 60°C und zentrifugierten dann das denaturierte Protein ab. Wenn gleichzeitig die PDC durch höhere Konzentrationen von Phosphat, Sulfat oder Glycerin vor proteolytischer Aktivität geschützt wurde, konnten sie mit diesem Verfahren die Inaktivierung von Protease-B erreichen. Allerdings konnte keine komplette Zerstörung der Protease-A und des inaktiven Protease-B/Protease-B-Inhibitor-Komplexes erzielt werden. In der übrigen Literatur finden sich über die Stabilität der Proteasen beim Erhitzen nicht ganz übereinstimmende Angaben. Viele Untersucher erhitzen außerdem nur bis maximal 45°C. Eine Zusammenstellung der vorliegenden Aussagen mit einer Literaturübersicht findet sich bei Pringle³⁸. Demnach ist Protease-A bei pH-Werten zwischen 5 und 6 bis ca. 50°C stabil. Bei höheren pH-Werten und Temperaturen nimmt die Stabilität jedoch rasch ab. Für Protease-B finden sich unterschiedliche Angaben im Hinblick auf die Thermostabilität. Sie verliert offensichtlich nur wenig Aktivität bei 50°C und pH 6. Insgesamt verspricht der Erhitzungsschritt eine Reduktion der proteolytischen Aktivität sowie, nach den Angaben von Juni und Heym³³, auch eine Anreicherung der PDC. Es wurde deshalb versucht, diesen Schritt zusätzlich in das PDC-Darstellungsverfahren nach Ullrich⁴ einzubauen.

Vorausgehen mußte eine generelle Untersuchung der Thermostabilität der Bierhefe-PDC. Juni und Heym hatten diese Frage für die Bäckerhefe in umfangreichen Versuchsreihen geklärt.³³ Aber auch hier zeigte sich,

daß signifikante Unterschiede von Stamm zu Stamm bestehen, so daß hier zumindest auf orientierende Untersuchungen nicht verzichtet werden konnte. Nach den Ergebnissen von Juni und Heym³³ konnte eine optimale Thermostabilität der PDC in 1 M Phosphatpuffer im neutralen Bereich erwartet werden, vorausgesetzt, die TPP-Konzentration liegt wenigstens bei 0,001 M und die MgSO_4 -Konzentration bei 0,002 M.

Das nach Ullrich gewonnene Rohenzym zeigte vom enzymkinetischen Standpunkt ausreichende Sättigung an TPP und MgSO_4 . Die spezifische Aktivität ließ sich jedenfalls durch weitere Zugabe von MgSO_4 und TPP nicht mehr steigern. Wieweit damit auch Schutz beim Erhitzen besteht, mußte geklärt werden. Juni und Heym hatten als Maß für die Thermostabilität die spezifische Aktivität der PDC verwendet. Im folgenden wurden aber auch die Totalproteinverluste durch Denaturierung während des Erhitzens nicht außer Acht gelassen, soweit sie die Gesamtausbeute an PDC reduzierten.

Es wurden jeweils 1 ml verschiedener Chargen von Rohenzym Lösungen (5 - 10 mg Protein/ml) 30 Minuten bei 56°C in 0,05 M, 0,5 M und 1 M Phosphatpuffer von pH 6,8 erhitzt. Dabei wurde der Einfluß steigender MgSO_4 - und TPP-Konzentrationen auf die Thermostabilität der PDC untersucht.

	Rohenzym 1			Rohenzym 2			Rohenzym 3		
Phosphatpufferkonz. (Mol/l)	0,05	0,5	1,0	0,05	0,5	1,0	0,05	0,5	1,0
Spez. Akt. vor Erhitzen (mU/mg)	34	31	32	28	29	31	20	22	22
Spez. Akt. nach Erhitzen (mU/mg)	20 (60%)	28 (40%)	37 (25%)	0 (70%)	0 (65%)	16 (30%)	0 (68%)	3 (65%)	24 (34%)
Spez. Akt. nach Erhitzen und Zugabe von 0,05 ml 0.1 mol. MgSO ₄ -Lös./ml Proteinlösung	21 (60%)	25 (24%)	35 (24%)	0 (72%)	0 (65%)	15 (32%)	0 (64%)	2 (58%)	26 (24%)
Spez. Akt. nach Erhitzen und Zugabe von 0,05ml 0.15 mol. TPP-Lösung/ml Proteinlösung	26 (43%)	26 (34%)	36 (25%)	4 (65%)	10 (50%)	20 (29%)	10 (65%)	12 (65%)	23 (30%)
Spez. Akt. nach Erhitzen und Zugabe von 0.075 ml 0.15 mol TPP-Lösung/ml Proteinlösung	25 (40%)	27 (35%)	36 (25%)	6 (62%)	6 (60%)	19 (32%)	10 (66%)	12 (55%)	22 (30%)

Tabelle 7: Spezifische Aktivität (mU/mg) der PDC als Maß für die Thermostabilität bei verschiedenen Phosphat-, MgSO₄- und TPP-Konzentrationen. In Klammern die Proteinverluste durch das Erhitzen in % des Proteingehaltes der Ausgangslösung. Probevolumen jeweils 1 ml Proteinlösung.

Die Untersuchungen bestätigen die Befunde von Juni und Heym auch für die Bierhefe-PDC. Es sollte in einem 1 M Phosphatpuffer erhitzt werden, wobei die Zugabe von 0,05 ml 0.15 mol TPP-Lösung sicher ausreichend für optimale Thermostabilität der PDC ist. Der Mg-Gehalt des nach Ullrich dargestellten Rohenzym reicht offensichtlich aus.

Die Hitzestabilität von nach Ullrich⁴ oder Ludewig und Schellenberger³⁵ gereinigten Enzymen erwies sich, unabhängig von den Bedingungen, als gering. In 1 M Phosphatpuffern wurden bei ausreichender TPP-Sättigung maximal 30% der spezifischen Ausgangsaktivitäten gefunden. Bei geringeren Phosphatpufferkonzentrationen trat Totalverlust der Aktivität ein.

Als Erklärung für die höhere Thermostabilität der PDC bei hohen Phosphatpuffer- und TPP-Konzentrationen diskutierten Juni und Heym³⁹ verschiedene Möglichkeiten:

1. Das Vorhandensein von intaktem Holoenzym ist Voraussetzung für die Thermostabilität. Hitze führt zur Dissoziation des MG-TPP-Protein-Komplexes. Der Zusatz von TPP, ebenso der Zusatz hoher Phosphatkonzentrationen, kann die Dissoziation verhindern.
2. Hohe Phosphatkonzentrationen hemmen eine saure Phosphatase, die häufig in Hefepräparaten vorhanden ist und die bei höheren Temperaturen auch enzymgebundenes TPP zu Thiamin und Phosphat hydrolysieren kann.
3. Hohe Phosphatkonzentrationen hemmen die in den Hefepräparaten fast immer vorhandenen Proteasen.

Es konnte festgestellt werden, daß Apoenzym in erheblich stärkerem Maße durch Proteasen und hier offensichtlich durch Protease B und C (vgl. B.2.1.2.) angegriffen wird als Holoenzym. Es wurde nach Ullrich gereinigte PDC parallel sowohl bei pH 6,8, wie bei pH 8,6 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Proben anschließend in 1%-SDS-Lösung von 96°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben wie üblich in einer SDS-PAGE untersucht. Die bei pH 8,6 inkubierte Probe zeigte gegenüber der bei pH 6,8 inkubierten eine reduzierte PDC-Bande, dafür aber intensivere und vermehrte Begleitbanden. Auch fallen bei der Inkubation von PDC bei pH-Werten über 8 immer gewisse Mengen von Protein aus. In der SDS-PAGE ergibt dieser Niederschlag eine breite verschmierte Bande im Molekulargewichtsbereich um 8 000. Offensichtlich handelt es sich hierbei um durch Proteolyse entstandene, in dem vorliegenden Puffer unlösliche Spaltpeptide.

Diese Befunde passen zu der von Juni und Heym postulierten, oben unter 1. aufgeführten Hypothese über den Effekt hoher TPP- bzw. Phosphat-Konzentrationen.

Der Effekt der unter 2. erläuterten Hydrolyse von TPP unter dem Einfluß einer sauren Phosphatase müßte eigentlich reversibel sein, d.h. wenn nach dem Erhitzen höhere TPP-Konzentrationen zugegeben werden, müßte zumindest eine graduelle Steigerung der PDC-Aktivität möglich sein. In den dazu durchgeführten Versuchen konnte keinerlei PDC-Aktivität gefunden werden.

Wenn angenommen wird, daß TPP nicht angelagert werden kann, weil die TPP-Bindungsstellen am Enzym durch Thiamin besetzt sind, müßte es möglich sein, durch Umpuffern auf pH 8,6 das Thiamin abzuspalten, durch Filtration über Sephadex G-25 abzutrennen und das gewonnene Apoenzym durch TPP/MgSO₄-Zugabe erneut zum aktiven Holoenzym zu rekombinieren. Dazu durchgeführte Versuche führten auch in keinem Fall wieder zu einer Erhöhung der PDC-Aktivität. Die beim Erhitzen gesteigerte Aktivität einer sauren Phosphatase, als dominierende Ursache für die Aktivitätsverluste der PDC beim Erhitzen, ist deshalb wenig wahrscheinlich.

Zur Abklärung der Hypothese 3 von Juni und Heym³⁹ sollten die folgenden Versuche zum einen den Effekt des Erhitzens, zum anderen den Effekt von hohen Phosphatpufferkonzentrationen auf die Proteasenaktivität aufzeigen.

Dazu wurden die Proteasenaktivitäten der im vorhergehenden (vgl. Tab.7), im Hinblick auf ihre Thermostabilität, untersuchten Rohenzym-Präparate, vor und nach Erhitzen, in 0,05 M und 1,0 M Phosphatpuffer untersucht.

	Rohenzym 1		Rohenzym 2		Rohenzym 3	
	0,05 M	1 M	0,05 M	1 M	0,05 M	1 M
Protease A						
E 280/mg	0,028	0,020	0,087	0,050	0,049	0,036
Protease B						
E 546/mg	0,012	0,003	0,054	0,030	0,036	0,034
Protease C						
E 578/mg	0,100	0,090	0,408	0,343	0,320	0,210

Tabelle 8: Spezifische Proteasenaktivität (E/mg nach 30 Minuten Inkubationszeit) bei unterschiedlichen Phosphatpufferkonzentrationen. Es wurden für die Proteasentests die Ansätze nach Juni und Heym³⁹ verwendet. Die Proteinlösungen waren vor den Proteasetests ca. 6 h in den entsprechenden Pufferlösungen bei Raumtemperatur inkubiert worden.

Der Vergleich der Ergebnisse mit denen von Tab. 7 zeigt eine deutliche Korrelation zwischen Proteasenaktivität und Thermostabilität. Je höher die Proteasenaktivität ist, um so geringer ist die Thermostabilität. Weiter sind die Proteasenaktivitäten der in 1 M Phosphatpuffer inkubierten Präparate deutlich geringer als die der in 0,05 M Phosphatpuffer inkubierten. Diese schon nach Inkubation bei Raumtemperatur zu beobachtende Reduzierung von Proteasenaktivitäten durch hohe Phosphatpufferkonzentrationen war, wie Tabelle 9 zeigt, noch erheblich deutlicher nach Inkubation bei 56°C.

	Rohenzym 1		Rohenzym 2		Rohenzym 3	
	0,05 M	1 M	0,05 M	1 M	0,05 M	1 M
Protease A E _{280/mg}	0.075 (+168)	0.020 (± 0%)	0.143 (+64 %)	0.045 (-10%)	0.241 (+392%)	0.035 (-3%)
Protease B E _{546/mg}	0.018 (+50%)	0.005* (+67%)	0.091 (+69%)	0.025 (-17%)	0.055 (+52%)	0.027 (-21%)
Protease C E _{578/mg}	0.160 (+60%)	0.090 (± 0%)	0.442 (+8%)	0.285 (-17%)	0.475 (+48%)	0.200 (-5%)

*Werte zu klein, deswegen nicht signifikant

Tabelle 9: Spezifische Proteasenaktivität (E/mg nach 30 Min. Inkubationszeit) nach Erhitzen bei unterschiedlichen Phosphatpufferkonzentrationen. (30 Min. bei 56°C). In Klammer die Erhöhung bzw. Erniedrigung der Proteasenaktivität (in %) gegenüber der Ausgangslösung vor dem Erhitzen (vgl. Tab. 8).

Das Erhitzen in 0.05 molarem Phosphatpuffer führte in jedem Fall zu einer Aktivierung aller Proteasen.

Wird in 1 M Phosphatpuffer erhitzt, tritt eine nur geringe Reduktion der Aktivität von Protease-A, eine 10 - 20% Reduktion von Protease-B und eine 0 bis 20% Reduktion von Protease-C ein. Wie berichtet, waren die Ergebnisse von Juni und Heym³⁹ im Hinblick auf die Hemmung von Protease-A und -B ungleich besser, die Wirkung auf Protease-C war nicht untersucht worden.

In einem orientierenden Versuch war Rohenzym 2 in 0.05 M und 1 M Puffer mit 0,05 ml 0,15 M TPP-Lösung/ml Proteinlösung erhitzt worden und die Proteasenaktivität mit der des ohne TPP-Zusatz erhitzten Rohenzym 2 verglichen worden. Es zeigten sich keinerlei systematische Unterschiede. Offensichtlich reicht die in Rohenzym-Präparaten nach Ullrich vorhandene TPP-Konzentration aus, um optimale Stabilität des Holoenzym und damit Thermostabilität zu sichern.

Die Interpretation der in obigen Tabellen niedergelegten Beobachtungen ist nur hypothetisch möglich. Hohe Phosphatkonzentrationen hemmen offensichtlich Proteasen bzw. hemmen die Aktivierung von Proteasen, was auf einer Stabilisierung von Protease/Protease-inhibitor-Komplexen beruhen könnte. Dieser Effekt wird besonders deutlich beim Erhitzen, vermutlich, weil diese Komplexe dabei sonst sehr leicht zerfallen. Gleichzeitig ist natürlich zusätzlich davon auszugehen, daß die hohen Phosphatkonzentrationen stabilisierend auf das PDC-Holoenzym beim Erhitzen wirken.

Es muß natürlich auch eine Inaktivierung von aktiven Proteasen durch die Erhitzung also z.B. durch Denaturierung ins Auge gefaßt werden. Nach Juni und Heym³⁹ ist diese bei Protease B nahezu komplett. Trotzdem wurden hier nach dem Erhitzen in 0.05 M Phosphatpuffer höhere und in 1 M Phosphatpuffer nur geringfügig reduzierte Aktivitäten der Protease B gefunden. Das könnte erklärt werden, wenn eine Aktivierung von hitzestabilen Protease-B/Protease-B-Inhibitor-Komplexen durch Protease-A nach dem Erhitzen angenommen wird (vgl. Schema Abb.16).

Auf dieser Stufe der Enzympräparation ist die Erhitzung jedenfalls sicher kein empfehlenswerter zusätzlicher Reinigungsschritt. Selbst wo es zu keiner Steigerung der Proteasen-Aktivität kam, war die spezifische Aktivität der gereinigten Präparate nicht oder kaum höher als ohne Hitzebehandlung. Die Ausbeute war in jedem Fall mindestens 30% schlechter.

Juni und Heym³³ hatten den Rohextrakt getrockneter Hefezellen 30 Min. bei 60°C gehalten, also den Erhitzungsschritt auf einem erheblich früheren Stadium der PDC-Präparation durchgeführt. Zum Vergleich wurde das Protein im Mazerationssaft von getrockneter Hefe mit Ammoniumsulfat ausgefällt und jeweils in 1 M Phos-

phatpuffer, der Magnesiumsulfat (0,002 Mol/l) und TPP (1 mg/ml) enthielt, gelöst. Anschließend wurde 30 Min. bei 56°C erhitzt, nach Abkühlen das ausgefallene Protein abzentrifugiert und der Überstand, wie üblicherweise der Mazerationssaft nach Ullrich, weiterverarbeitet. Die spezifische Aktivität im Mazerationssaft, die nach dem Erhitzungsschritt im Überstand um ca. 100% höher war als vorher im Mazerationssaft, entsprach am Ende der Prozedur dann in etwa der des Rohenzyms, das ohne Erhitzungsschritt dargestellt worden war. Die Gesamtproteinausbeute betrug jedoch nur ca. 70 - 80% der üblicherweise erhaltenen. Es wurde deshalb der Erhitzungsschritt auch auf dieser Stufe nicht routinemäßig in das Darstellungsverfahren der PDC eingebaut.

Zugabe von Protease-Inhibitoren.

PMSF und DFP sind als spezifische, irreversible Inhibitoren vieler Proteasen beschrieben worden^{50, 51, 52}. Sie reagieren offensichtlich mit Serin-Resten im aktiven Zentrum von Proteasen. Obwohl in der Literatur DFP größere Wirksamkeit zugesprochen wird als PMSF^{53,54}, schied der Einsatz von DFP, wegen der großen Giftigkeit dieser Verbindung, bei der routinemäßigen Präparation der PDC aus.

PMSF wurde entsprechend Pringle³⁸ in jeweils frisch zubereiteter, 40 mM Lösung in 95%igem Alkohol eingesetzt. Der Anteil der PMSF-Lösung an den behandelten Enzymlösungen betrug ca. 1:20. Vorversuche hatten gezeigt, daß PMSF in den beschriebenen Konzentrationen keinen Einfluß auf die PDC-Aktivität zeigt.

Zunächst wurden verschiedene Rohenzymchargen mit PMSF behandelt und ihre Proteasenaktivität vor und nach der Behandlung (ca. 2 Stunden nach Zugabe von PMSF) gemessen. Das Rohenzym wurde dazu in 0,05 M Natriumphosphatpufferlösung von pH 6,8 gelöst.

	Protease-A		Protease-B		Protease-C	
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher
Rohenzym 1	0,120	0,070	0,108	0,020	nicht gemessen	
Rohenzym 2	0,232	0,185	0,060	0,020	7,200	0,000
Rohenzym 3	0,080	0,060	0,090	0,010	7,500	0,400
Rohenzym 4	0,091	0,057	0,173	0,040	8,800	0,030

Tabelle 10: Proteasenaktivität (E/mg nach 30 Minuten Inkubationszeit) in PDC-Rohenzym vor und nach der Behandlung mit PMSF.

Protease-B und -C wurden durch PMSF weitgehend inhibiert. Dieser Befund entspricht auch den Angaben von Juni und Heym³⁹. Protease-A, die als PMSF resistent gilt,³⁹ verlor bei diesen Versuchen überraschend auch 20 bis 40 % der Ausgangsaktivität.

Eine Erhöhung der PMSF-Konzentration brachte keine weitere Steigerung der Inhibitor-Wirkung. Auch der Einsatz von PMSF schon bei der Autolyse der Hefezellen brachte keine Verbesserung der Rohenzymqualität, was zeigt, daß die Protease/Proteaseinhibitor-Komplexe bei den Autolyse-Bedingungen wohl weitgehend stabil sind. Das mit PMSF behandelte Rohenzym zeigte, gelöst in 0,05 molarem Phosphatpuffer von pH 6,8, bei Raumtemperatur ca. 7 Tage unveränderte Aktivität, während nicht mit PMSF behandelte Vergleichspräparate schon nach 24 Stunden 75 % ihrer Aktivität verloren hatten. Nach Filtration der auf verschiedenen Reinigungsstufen mit PMSF behandelten Rohenzyme über Sephadex G 200 zeigten die gereinigten Präparate ebenfalls eine erheblich bessere Stabilität als die aus unbehandeltem Rohenzym gewonnenen. Es wurde bei 4°C in 0,05 M Phosphatpufferlösung von pH 6,8 über 12 Tage kein Aktivitätsverlust festgestellt, während ein aus unbehandeltem Rohenzym gewonnenes, gereinigtes Präparat schon nach 12 Stunden 80% seiner Aktivität bei gleichen Bedingungen verloren hatte.

Eine Ammoniumsulfatsuspension der PDC zeigte bei Präparaten, die aus vorbehandelten Rohenzymen gewonnen worden waren, bei 4°C noch nach 3 Monaten unverminderte Aktivität, während bei Präparaten, die aus unbehandeltem Rohenzym gewonnen wurden, nur noch 25% der Ausgangsaktivität nach dieser Zeit gemessen wurden.

Allerdings, und darauf weisen auch andere Untersuchungen hin³⁸, zeigen auch mit PMSF behandelte Präparate z.B. nach Inkubation bei pH 5 wieder höhere Aktivitäten der Proteasen-B und -C, was bestätigt, daß PMSF offensichtlich nicht oder nur ungenügend auf Protease/Proteaseinhibitor-Komplexe einwirkt. Der relativ geringe Einfluß von PMSF auf Protease-A machte es nötig, nach anderen Möglichkeiten zur Reduzierung ihrer Aktivität zu suchen. Wie mehrere Autoren - eine Übersicht findet sich bei Pringle³⁸ - zeigten, wird Protease-A bei pH-Werten über 8 schon bei Raumtemperatur schnell inaktiviert. Wie einige orientierende Vorversuche ergaben, ist dieser Effekt bei pH 8 noch nicht sehr ausgeprägt, nimmt jedoch bei höheren pH-Werten rasch zu. Diese Beobachtung erklärt auch, warum Apoenzym offensichtlich bei pH 9 stabiler ist als bei pH 8 (vgl. B 2.1.2.). Es wurde im folgenden die Aktivität der Protease-A in einer 0,05 M Phosphatpufferlösung von pH 6,8 gemessen (10 mg/ml PDC-Präparat), dann mit 1 N NaOH der pH-Wert auf 8,6 erhöht und nach 15 Min., 30 Min. und 60 Min. Inkubation erneut die Protease-A-Aktivität bestimmt. Anschließend wurde mit 1 N Phosphorsäure auf pH 6,8 umgepuffert und nach 30 Min. erneut die Protease-A-Aktivität bestimmt.

	pH 6,8	pH 8,6 10 min. n. Umpuffern	pH 8,6 20 min. n. Umpuffern	pH 8,6 30 min. n. Umpuffern	pH 6,8 30 min. n. Umpuffern
Aktivität der Protease-A E_{280}/mg (30 Min.)	0,295	0,095	0,070	0,055	0,045

Tabelle 11: Irreversible Inaktivierung der Protease-A
in einem Milieu von pH 8,6.

Zwar nahm die Aktivität der Protease A bei pH 8,6 innerhalb von 30 min. um 80% ab (irreversibel), doch trat während der gleichen Zeit ein Verlust von ca. 30 bis 40% der spezif. Aktivität der PDC ein, (nach Umpuffern und MgSO_4 /TPP-Zugabe gemessen), so daß dieser Schritt nicht routinemäßig in das PDC-Darstellungsverfahren eingebaut wurde.

2.3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der proteolytischen Aktivität in den PDC-Präparaten.

Die Untersuchungen der Proteasen-Aktivität der PDC-Präparate sowie die Versuche zur Reduzierung der Proteasen-Aktivität zeigen ein sehr unübersichtliches Bild. Es muß davon ausgegangen werden, daß die untersuchten Proteasen A, B und C sowohl in aktiver Form wie in inaktiver Form, vermutlich als Komplexe mit Inhibitoren, in den PDC-Präparaten vorkommen. Die Aktivierung kann, wie gezeigt wurde, durch verschiedene Versuchsbedingungen erfolgen, sie kann aber, wie von vielen Autoren gezeigt wurde, auch durch die Proteasen gegenseitig erfolgen. Das hierfür von Saheki et al.⁵⁵ angegebene Schema veranschaulicht die komplexen Beziehungen sehr gut, besonders wenn dabei berücksichtigt wird, daß dieses System ja nicht geschlossen ist, sondern daß praktisch

an jeder Stelle auch Außeneinflüsse (pH, Denaturierungsmittel, Temperatur, Protease/Proteaseinhibitor stabilisierende Verbindungen usw.) einwirken können.

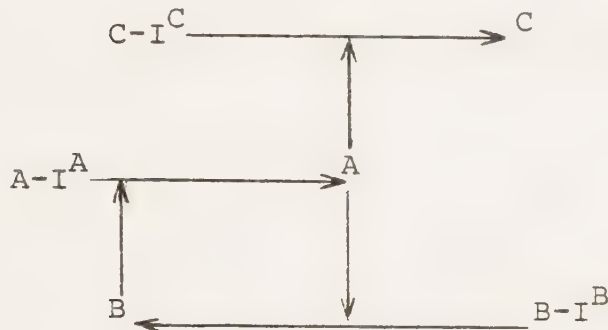


Abb.16: Gegenseitige Aktivierung der Proteasen A, B und C nach Saheki et al.⁵⁵ (I = Inhibitoren der Proteasen A, B und C)

Weiter muß berücksichtigt werden, daß sich bei den Reinigungsschritten natürlich aktive Proteasen anders verhalten als Protease/Proteaseinhibitor-Komplexe (Molekulargewicht, IEP, Stabilität usw.). Es muß zumindestens in einigen Fällen davon ausgegangen werden, daß Proteasen wegen Adsorption an das zu reinigende Protein schlecht oder gar nicht abzutrennen sind. Da Proteasen bereits in Spuren starke Proteolyse verursachen können, sind die Effekte auf die gereinigten Enzympräparate erheblich. Schließlich muß davon ausgegangen werden, daß neben den hier untersuchten Proteasen auch weitere Proteasen in den PDC-Präparaten enthalten sind, über deren Verhalten noch nichts bekannt ist.

Von den untersuchten antiproteolytischen Maßnahmen zeigte nur die wiederholte Behandlung mit PMSF befriedigende Ergebnisse. Auch Juni, der seine Versuche zur Elimination der Proteasenaktivität in Bäckerhefe zunächst fortgesetzt

hatte, gelang es nicht, die Proteasenaktivität in seinen Präparaten völlig zu eliminieren. Inzwischen hat seine Arbeitsgruppe die Arbeiten an der PDC eingestellt⁵⁶.

2.4.0. Optimiertes Verfahren zur Darstellung gereinigter PDC.

Als Resultat der unter 2.0. bis 2.3. beschriebenen Untersuchungen wird folgendes Verfahren zur Reinigung von PDC vorgeschlagen:

Nach Ullrich dargestelltes Rohenzym wird mit einer Zonenpräzipitation (vgl. 2.2.5.) vorgereinigt und anschließend über Sepharose 6B filtriert. Sowohl das Rohenzym wie der aus der Zonenpräzipitation stammende Pool werden mit PMSF behandelt. Im typischen Fall ergibt diese Vorreinigung die unter 2.2.5. beschriebenen Ergebnisse (vgl. auch Abb. 14). Das Ergebnis der anschließenden Sepharose 6B Filtration ist in Abb. 17 dargestellt.

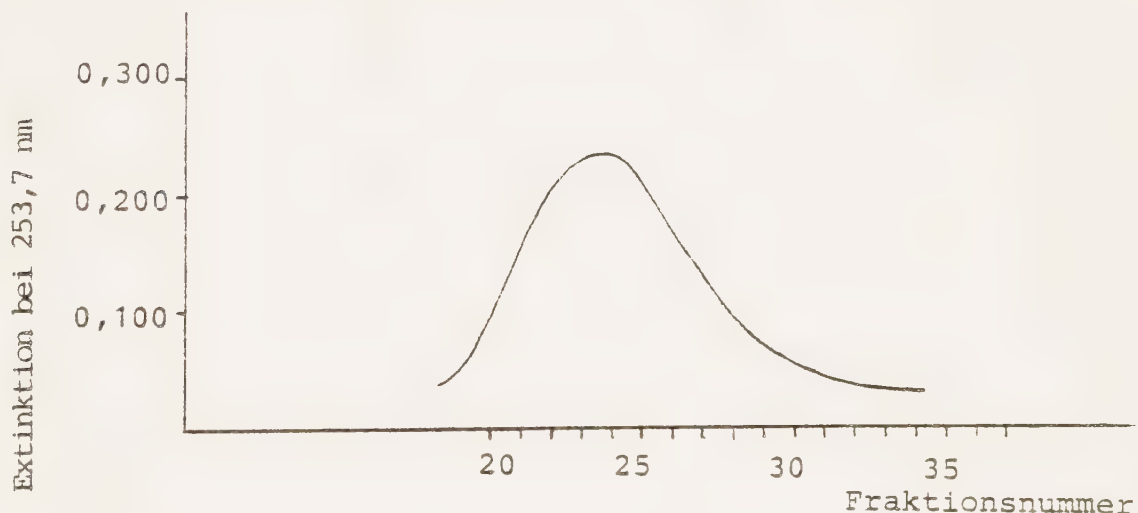


Abb. 17: Gelfiltration der Fraktionen 46 bis 68 einer Gradienten-Elution von PDC-Rohenzym (vgl. Abb. 14) über Sepharose 6B (Säulenmaße 110 x 2 cm; Betthöhe 90 cm; Elutionsgeschwindigkeit 16 ml/h; Fraktionsvolumen 6 ml).

Die PDC wurde mit einem leicht asymmetrischen Peak eluiert. Die Fraktionen 20 - 24 zeigten nach densitometrischer Auswertung der SDS-PAGE weniger als 5% Fremdprotein. Das Verfahren erwies sich als gut reproduzierbar, wie Abb. 18 zeigt.



Abb.18: SDS-PAGE nach Weber und Osborn¹⁶ der Fraktionen 22 dreier verschiedener Enzympräparationen entsprechend dem hier vorgeschlagenen Verfahren.

Die spezifischen Aktivitäten und die erzielten Ausbeuten gehen aus folgendem Protokoll einer Reinigung hervor.

	mU/ml	mg/ml	mU/mg	PDC-Gehalt in %
In Zonenpräzipitationen eingebrachtes Rohenzym	345	11,5	30	-
Pool F ₄₆ - F ₇₈ aus Zonenpräzipitation	60	1,1	55	80 %
F ₂₁ aus Gelfiltration	7,3	0,12	61	100 %
F ₂₂ aus Gelfiltration	65	0,7	93	100%
F ₂₃ aus Gelfiltration	120	1,5	80	98 %
F ₂₄ aus Gelfiltration	126	1,8	70	95 %
F ₂₅ aus Gelfiltration	100	1,7	59	90 %
F ₂₆ aus Gelfiltration	52	1,3	40	90 %
F ₂₇ aus Gelfiltration	18	0,8	23	85 %

Tabelle 12: Protokoll der Reinigung von PDC aus nach Ullrich dargestelltem Rohenzym mit Zonenpräzipitation (vgl. Abb. 14) als erstem und Sepharose 6B-Gelfiltration (vgl. Abb. 17) als zweitem Trennungsschritt.

Die Stabilität des gewonnenen Reinenzyms entspricht den unter 2.3 gemachten Angaben.

Bei der Untersuchung der Aktivitäten der Proteasen A, B und C fand sich in den reinsten Fraktionen nur eine geringe Aktivität von Protease-A. Da dieses Ergebnis auf einen zusätzlichen Proteasen-Abtrennungseffekt durch die Zonenpräzipitation deutet, wurden die Fraktionen der Zonenpräzipitation Proteasentests unterzogen.

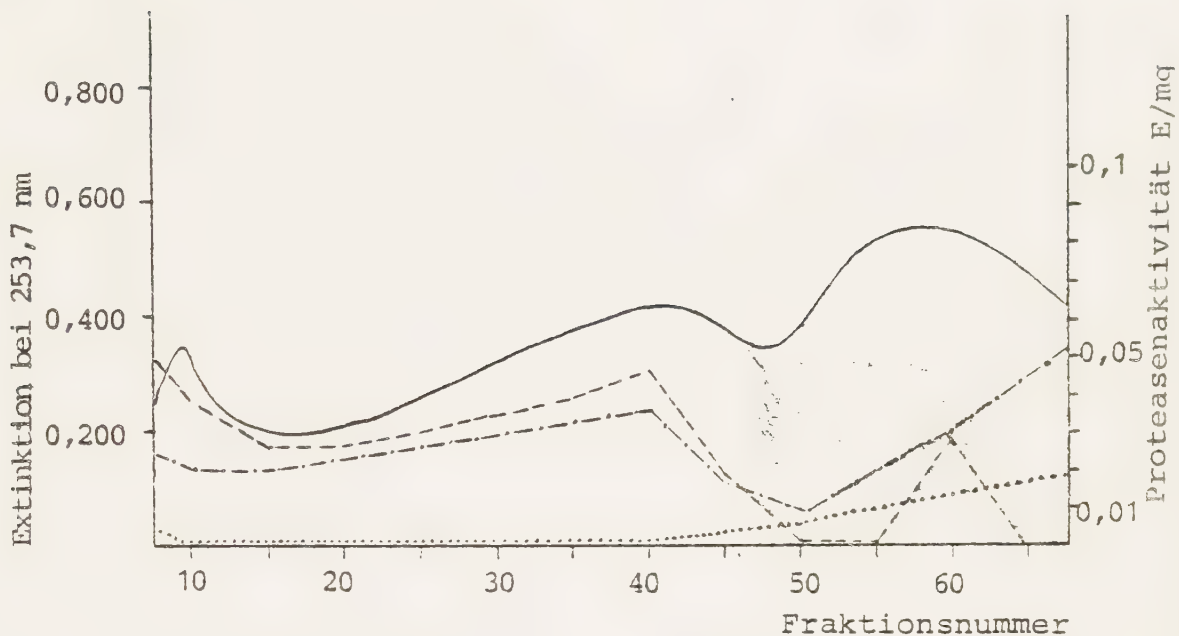


Abb. 19: Aktivität der Proteasen A (-----),
-B (.....) und C (-.-.-.-) in den
Fraktionen einer Gradientenelution von
PDC-Rohenzym entsprechend Abb. 14.
Grau unterlegt die Fraktionen die für
die Refiltration über Sepharose 6B
eingesetzt wurden.

Es zeigte sich, daß bei der Gradientenelution
Protease A vor dem PDC-Gipfel und die Proteasen-B
und -C vorwiegend nach dem PDC-Gipfel eluiert
werden. Die im Sepharose 6B Filtrat gefundene
Protease-C-Aktivität kann weitgehend eliminiert
werden, wenn nur die Fraktionen 46 - 60 der Gra-
dientenelution für die Refiltration eingesetzt
werden. Allerdings schmälert das die Ausbeute
der Darstellung um ca. 40%.

Das hier vorgeschlagene Verfahren zur Reindarstellung
der PDC stellt eine deutliche Verbesserung der bisher
in der Literatur beschriebenen Verfahren dar.

Wenn es auch die Nachteile anderer Verfahren nicht völlig eliminiert, so zeigen die hiermit gewonnenen Enzymproben eine erheblich bessere Stabilität, wesentlich geringere Proteasenaktivitäten und einen deutlich verminderten Anteil von Fremdprotein. Als Resultat der geringeren Proteasenaktivität ist dieses Verfahren besser reproduzierbar als alle im Verlauf dieser Arbeit untersuchten Darstellungsmethoden anderer Autoren.

3.0.0. Überarbeitung physikalischer Daten der PDC.

Während der beschriebenen Arbeiten zur Reinigung der PDC wurde eine Reihe von Beobachtungen gemacht, die im Widerspruch zu den bisher bekannten Angaben über Molekulargewicht, IEP und Anzahl der Untereinheiten der PDC standen.

Die folgenden Untersuchungen dienten der Abklärung dieser Widersprüche.

3.1.0. Molekulargewicht von Holoenzym, Apoenzym und Untereinheiten der PDC.

Das Ergebnis erster Versuche, das Molekulargewicht der PDC zu bestimmen, wurde von Melnick und Stern⁴⁴ schon 1940 publiziert. Sie fanden in der Ultrazentrifuge nach dem von Svedberg⁵⁷ angegebenen Verfahren ein Molekulargewicht von 141.000.

Ein Jahr später gaben Kubowitz und Lüttgens⁴² sowie Green et al.⁴³ als Molekulargewicht 75000 - 100000 bzw. 100000 an. Sie leiteten ihre Befunde vom TPP-Gehalt der PDC ab.

1966 und 1969 veröffentlichten Ullrich et al.^{5,6} die Ergebnisse von Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der Präparativen und der Analytischen Ultrazentrifuge. Sie fanden für das Holoenzym ein Molekulargewicht von 175.000 ± 5.000 , für das in 6 M Guanidin-HCl denaturierte Enzym 87.500 ± 2.500 . Diese Ergebnisse waren statistisch sehr gut abgesichert. Von ihnen gingen seit 1969 praktisch alle Untersucher der Bierhefe-PDC aus. Molekulargewichtsbestimmungen an dem Apo-Enzym der Bierhefe-PDC wurden bisher nicht durchgeführt.

1971 veröffentlichten Gounaris et al.¹⁸ Untersuchungen an der Bäckerhefe. Sie fanden mit der Gelfiltrationstechnik in Sephadex G-200 ein Molekulargewicht von 209.000. Bei einem pH-Wert von 8, Bedingungen also, bei denen das Apoenzym vorliegen müßte, mit der Gelfiltrationstechnik in Sephadex G-200 ein Molekulargewicht von 108.000, mit der Diskelektrophorese-technik nach Hedrick und Smith⁵⁸ ein Molekulargewicht von 118.000 ± 2.600 .

Ullrich⁵ hatte aus seinen Untersuchungen auf zwei gleiche Untereinheiten der Bierhefe-PDC vom Molekulargewicht 87.500 ± 2.500 geschlossen, obwohl er ursprünglich aus seinen Messungen des TPP-Gehalts der Bierhefe-PDC vier Untereinheiten erwartet hatte. Gounaris et al.¹⁸ gaben nun für die Bäckerhefe ebenfalls 2 Untereinheiten an, für die sie aber ein höheres Molekulargewicht als Ullrich, nämlich 118.000 ± 2.600 veröffentlichten. Nach ihren Untersuchungen dissoziiert das Holoenzym ab einem pH-Wert von 7,5, in Abhängigkeit vom Puffersystem, mehr oder weniger schnell in Untereinheiten vom halben Molekulargewicht.

Diese Dissoziation lief der Bildung des Apoenzyms parallel und war unter den gleichen Bedingungen reversibel, unter denen sich auch wieder das Holoenzym aus dem Apoenzym bildete.

Untersuchungen am denaturierten Enzym hatten Gounaris et al. erst nach Beendigung dieser Arbeiten durchgeführt und publiziert.⁶⁷

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen zur Reinigung der PDC wurde zur Reinheitsprüfung die SDS-PAGE nach Weber und Osborn¹⁶ eingesetzt. Das Verhalten der denaturierten PDC bei diesem Verfahren sprach für ein kleineres Molekulargewicht der Subunit als $87.500 \pm 2.500^{5,6}$ oder 108000 bzw. 118.000 ± 2.600^{18} .

Es war deshalb erforderlich, das Molekulargewicht der Bierhefe-PDC sowohl für das Holo- wie für das Apoenzym neu zu bestimmen und zu klären, ob das Apoenzym tatsächlich der Subunit entspricht, wie bisher alle Untersucher angaben.

Dazu wurde das Molekulargewicht der in 1%iger SDS-Lösung denaturierten PDC mit Hilfe der SDS-PAGE, entsprechend dem von Weber und Osborn¹⁶ angegebenen Verfahren, bestimmt. Das Molekulargewicht von Holo- und Apoenzym wurde mit der Gelfiltrationstechnik in Sephadex G-200 und Sepharose 6B bestimmt.

3.1.1. Molekulargewichtsbestimmung der PDC-Untereinheiten mit der SDS-PAGE.

Insgesamt wurden im Verlauf dieser Arbeit 15 SDS-PAGES in 5%igen und 10%igen Polyacrylamidgelen mit verschiedenen Referenzproteinen durchgeführt. Aus dem Katalog der von Weber und Osborn¹⁶ als geeignet befundenen Proteine wurden folgende ausgewählt:

Referenzprotein	Molekulargewicht der nach Denaturierung in SDS vor- liegenden Untereinheit ¹⁶
Ribonuclease	13 700
Trypsin	23 300
Lactat-Dehydrogenase	36 000
Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	36 000
Alkohol-Dehydrogenase	37 000
Aldolase	40 000
Pyruvat-Kinase	57 000
Katalase	60 000
Albumin-mono	68 000
-di	136 000
-tri	204 000
Phosphorylase	94 000

Tab. 13: Zur Molekulargewichtsbestimmung der PDC-Subunit in der SDS-PAGE eingesetzte Referenzproteine.

Die Literaturnachweise für die hier eingesetzten Molekulargewichte der durch SDS-Denaturierung entstehenden Untereinheiten finden sich bei Weber und Osborn¹⁶. Pro SDS-PAGE wurden mindestens 5 der oben angegebenen Referenzproteine eingesetzt. Jedes Referenzprotein wurde, wie auch die PDC, auf ein separates Gel aufgebracht. Als Bezugswert für die Berechnung der Rf-Werte wurde die Wanderungsstrecke von Bromphenolblau bzw. von in SDS denaturiertem Trypsin herangezogen. Dabei hatte der Einsatz von Trypsin Vorteile, weil die schärfer begrenzte Trypsin-Bande ein leichteres Ausmessen der Wanderungsstrecken im Gel erlaubte als die etwas diffuseren Banden von Bromphenolblau. Außerdem konnte bei Einsatz von Trypsin der Rf-Wert als einfacher Quotient

$$Rf = \frac{\text{Wanderungsstrecke zu bestimm. Protein}}{\text{Wanderungsstrecke Trypsin}}$$

ausgedrückt werden.

Bei der Verwendung von Bromphenolblau mußten die Rf-Werte der Produkte, um das Quellen der Gele beim Färben und Entfärben zu berücksichtigen, nach folgender Formel berechnet werden:

$$R_f = \frac{\text{Protein-Wanderungsstrecke}}{\text{Gellänge nach dem Entfärben}} \times \frac{\text{Gellänge vor d.Färben}}{\text{Wanderungsstrecke von Bromphenolblau}}$$

Die Rf-Werte wurden auf Millimeterpapier gegen die Logarithmen der Molekulargewichte der nach SDS-Denaturierung entstehenden Untereinheiten der Referenzproteine (oder auf semilogarithmischen Papier gegen die Molekulargewichte) aufgetragen. Die exakte Lage der Regressionsgeraden $y = a + b \cdot x$ wurde dann durch Errechnen der Steigung b und des Schnittpunktes mit der y-Achse a nach folgenden Gleichungen errechnet⁵⁹:

$$b = \frac{\sum (xy) - \bar{x} \sum (y)}{\sum (x^2) - \bar{x} \sum (x)}$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

$\sum (x)$ = Summe aller x

$\sum (y)$ = Summe aller y

$\sum (x^2)$ = Summe aller Quadrate von x

$\sum (xy)$ = Summe der Produkte von x und y
jedes Koordinatenpunktes

Lagen einzelne Koordinatenpunkte für Referenzproteine deutlich außerhalb der Referenzgeraden, wurde das entsprechende Gel nachuntersucht. So konnten einmal Meßfehler entdeckt werden, zum anderen konnte auch eine falsche Bandenzuordnung korrigiert werden. Die Gefahr einer falschen Bandenzuordnung bestand immer dann, wenn die Referenzproteine in der SDS-PAGE mehrere Banden zeigten, die offensichtlich entweder durch Begleitproteine oder durch Zerfallsprodukte des fraglichen Proteins (Proteolyse) hervorgerufen wurden.

Nach Vorliegen der Geradengleichung wurde der jeweils gemessene Rf-Wert der PDC (x) in die Gleichung eingesetzt und der zugehörige Logarithmus des Molekulargewichts (y) errechnet. Der dem Logarithmus zuzuordnende Numerus entspricht dem Molekulargewicht. Tabelle 14 und Abb. 20 zeigen das typische Protokoll einer Molekulargewichtsbestimmung der nach SDS-Denaturierung vorliegenden PDC-Untereinheiten mit Hilfe einiger Referenzproteine. Eingesetzt wurde die F 24-Fraktion einer Sepharose 6B Gelfiltration (nur eine Bande) entsprechend 2.4.0. sowie die F 18-Fraktion aus einer Sephadex G-200 Gelfiltration (3 Banden) entsprechend 1.1.0.

Referenzprotein	MG der nach SDS-Denat. entstehenden Untereinheiten ¹⁴	log MG	Rf-Werte
Ribonuclease	13.700	4,1367	1,14
Trypsin	23.300	4,3674	0,97
Alkohol-Dehydrogenase	37.000	4,5682	0,86
Aldolase	40.000	4,6021	0,79
Pyruvat-Kinase	57.000	4,7559	0,69
Phosphorylase	94.000	4,9731	0,49
Albumin mono	68.000	4,8325	0,62
Albumin di	136.000	5,1335	0,37
PDC-F ₁	59.900	4,7794	0,66
PDC-F ₅ Bande 1	59.900	4,7794	0,66
Bande 2	48.500	4,6855	0,73
Bande 3	8.550	3,9322	1,32

Tab. 14: Protokoll der Meßergebnisse einer Molekulargewichtsbestimmung der PDC-Untereinheiten in der SDS-PAGE nach Weber und Osborn¹⁶.

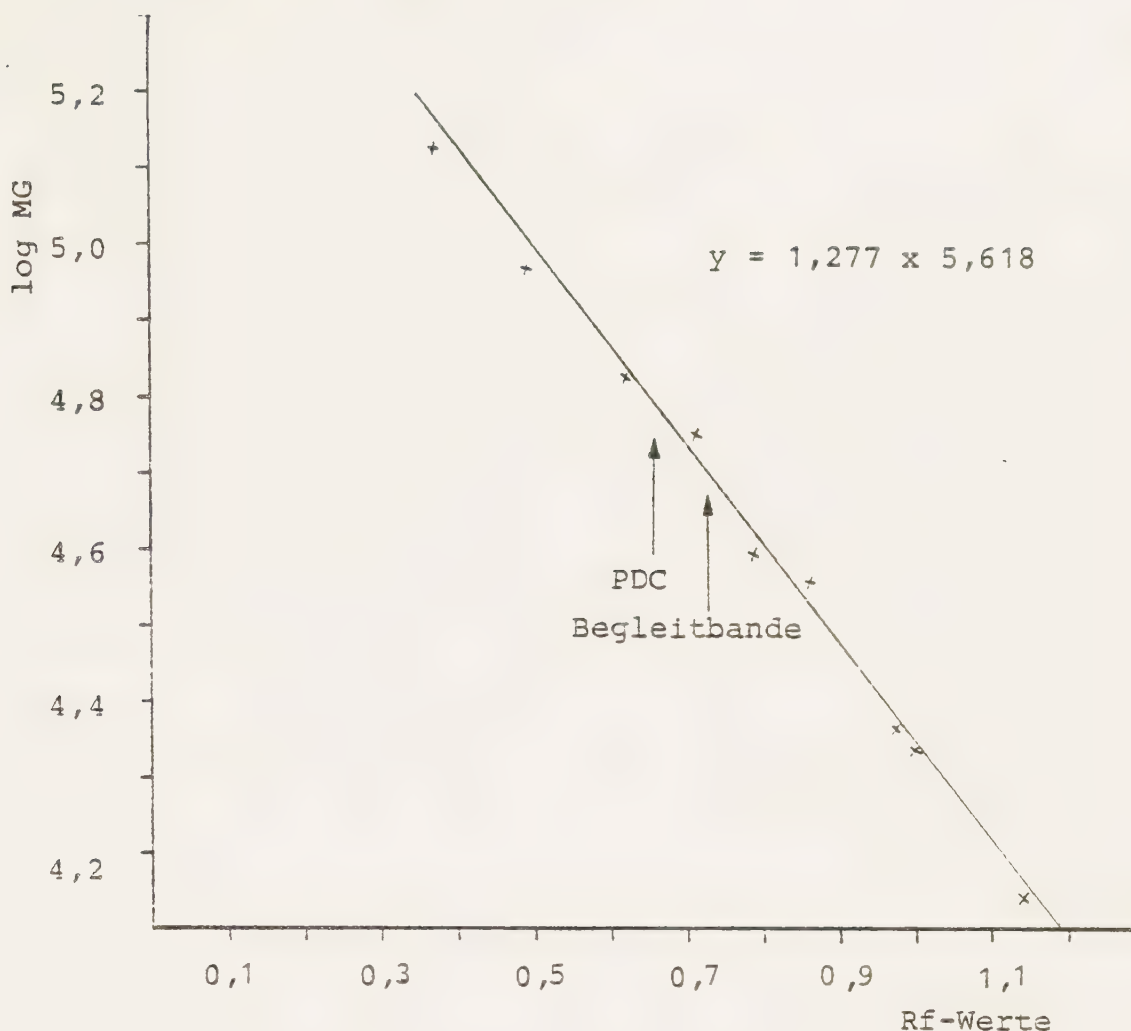


Abb.20: Referenzgerade einer Molekulargewichtsbestimmung der in 1%iger SDS-Lösung denaturierten PDC nach Weber und Osborn¹⁶ (vgl. Tabelle 14).

Der Mittelwert der Molekulargewichte (arithmetisches Mittel) aus 15 Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der SDS-PAGE wurde zu 61.000 berechnet. Die Werte der einzelnen Bestimmungen streuten mit einer Standardabweichung von $S_1 = \pm 3000$ um diesen Mittelwert. S_1 wurde nach $\sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n-1}}$ errechnet⁶⁰.

$\bar{x}$ = arithmet. Mittel aller Einzelwerte x
 n = Anzahl der Einzelwerte

Das Molekulargewicht der nach SDS-Denaturierung vorliegenden Untereinheit der PDC beträgt demnach 61.000 ± 3.000 ($\bar{x} \pm 1s$).

3.1.2. Molekulargewichtsbestimmung von Holo- und Apoenzym der PDC mit Gelfiltration

Zahlreiche Autoren haben in den letzten Jahren die Molekulargewichtsbestimmung mit der Gelfiltrationstechnik unter Verwendung von vernetzten Dextrangelen (Sephadex, Sepharose) beschrieben. Granath und Flodin⁶¹ hatten 1961 über eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts filtrierter Polysaccharide und dem Quotienten aus dem Elutionsvolumen dieser Polysaccharide und dem gesamten Gelbett-Volumen berichtet.

In der Folgezeit wurde die Eignung dieser Technik auch für die Bestimmung von Molekulargewichten bei Proteinen vielfach bestätigt^{62, 63, 64}. Es wurde empirisch eine Reihe von Beziehungen zwischen Molekulargewicht und verschiedenen, bei der Gelfiltration bestimmbaren Parametern gefunden, die die Errechnung des Molekulargewichts ermöglichen. Eine Übersicht findet sich bei Determann und Michel⁶⁵.

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen an der Bierhefe-PDC wurde die von Whitaker⁶⁶ erstmals angegebene Auswertemethode eingesetzt, die in Vorversuchen mit verschiedenen Referenzproteinen von bekannten Molekulargewichten sehr gute Ergebnisse gebracht hatte. Demnach besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts von Proteinen und dem Quotienten aus Elutionsvolumen und dem jeweiligen Ausschlußvolumen der verwendeten Säule. Dieses Verfahren hat, gegenüber den meisten anderen, den Vorteil, daß außer der Bestimmung des Elutionsvolumens der fraglichen Proteine sowie einer im Ausschlußvolumen eluierten Substanz, wie z.B. Dextranblau, keine weiteren Messungen erforderlich sind, was sicher der Reproduzierbarkeit des Verfahrens zugute kommt. Die bei den Molekulargewichtsbestimmungen eingesetzten Referenzproteine gehen aus Tabelle 15 hervor.

Referenzproteine	Molekulargewicht (entsprechend Herstellerangaben)
Trypsin	23.300
Carboanhydrase	31.000
Desoxyribonuclease	31.000
Albumin(Hühnereiweiß)	45.000
Albumin(Rind)	68.000
Aldolase	140.000
Alkohol-Dehydrogenase	150.000
Glucose-Oxidase	152.000
β -Amylase	201.000
Katalase	225.000

Tab. 15.: Zur Molekulargewichtsbestimmung mit der Gelfiltrationstechnik eingesetzte Referenzproteine.

Zur Bestimmung des Ausschlußvolumens wurde Dextranblau eingesetzt. In Sepharose 6B-Gelen werden ältere Chargen von Dextranblau allerdings nicht mehr voll ausgeschlossen. Es erscheint im Schreiberbild mit zwei sich überdeckenden Peaks. Der zuerst erscheinende markiert dabei das Ausschlußvolumen.

Die Bestimmungen wurden in einer 90 cm langen Säule von 2 cm Durchmesser durchgeführt. Die Gelbetthöhe betrug ca. 60 cm, das Gesamtbettvolumen lag in der Größenordnung von 200 ml. Die Proben wurden über Adapter aufgebracht, das Durchflußvolumen wurde mit einer Perperxpumpe bei 20 ml pro Stunde konstant gehalten. Als Säulenfüllung wurde anfangs Sephadex G-200, später nur noch Sepharose 6B gewählt. Es hatte sich gezeigt, daß im hohen Molekulargewichtsbereich bei Sephadex G-200 zuweilen nicht mehr volle Linearität gegeben war.

Die Referenzproteine wurden entweder einzeln (Trypsin immer) oder zusammen mit zwei oder drei anderen aufgetragen. Es wurden jeweils 15 bis 20 mg Protein in insgesamt 1 ml Puffer aufgebracht. Grundsätzlich

wurde in der Proteinlösung auch etwas Dextranblau zur Bestimmung des Elutionsvolumens gelöst. Das Elutionsvolumen für die einzelnen Referenzproteine wurde anhand des Absorptionsmaximums bei 253,7 nm (Uvicord) bestimmt. Für die PDC wurden im Eluat, das in 2 ml-Fractionen gesammelt wurde, Enzymaktivitätsbestimmungen durchgeführt und das Maximum der spezifischen Enzymaktivität zur Bestimmung des Elutionsvolumens herangezogen.

Die grafische bzw. rechnerische Ermittlung des Molekulargewichts erfolgte entsprechend den vorher für die Errechnung der Molekulargewichte in der SDS-PAGE angegebenen Verfahren. Zu Grunde gelegt wurde hier die Beziehung

$$\text{Log MG} \approx \frac{V_e}{V_o}^{66}$$

V_e = Elutionsvolumen der aufgetragenen Proteine.

V_o = Elutionsvolumen von Dextran (= Ausschlußvolumen)

Insgesamt wurden 5 Durchgänge mit Sepharose 6B und 2 Durchgänge mit Sephadex G-200 Füllungen durchgeführt. Während Apo-Enzym in Sephadex G-200 gut zu bestimmen war, wich der Koordinatenpunkt für Holoenzym, ebenso wie der für Katalase, bei Sephadex G-200 meist bereits deutlich nach oben von der Geraden ab. Im folgenden findet sich ein Protokoll für eine Molekulargewichtsbestimmung in Sepharose 6B sowie die sich ergebende Referenzgerade.

Referenzprotein	MG	Log Mg	V_e	$\frac{V_e}{V_o}$ (Dextran)
Carboanhydrase	31.000	4,4914	161,2	2,00
Albumin (Hühner- eiweiß)	45.000	4,6532	155,8	1,93
Albumin(Rind)	67.000	4,8261	148,9	1,85
Aldolase	147.000	5,1673	140,7	1,75
Katalase	225.000	5,3522	134,6	1,67
Dextranblau			80,6	
β -Amylase	201.000	5,3032	135	1,67
PDC-Holo	231.300	5,3643	134,2	1,66
PDC-Apo	118.000	5,0711	142,6	1,77

Tab. 16: Protokoll der Molekulargewichtsbestimmung von PDC-Holo- und Apoenzym mit der Gel-filtrationstechnik nach Whitaker⁶⁶.

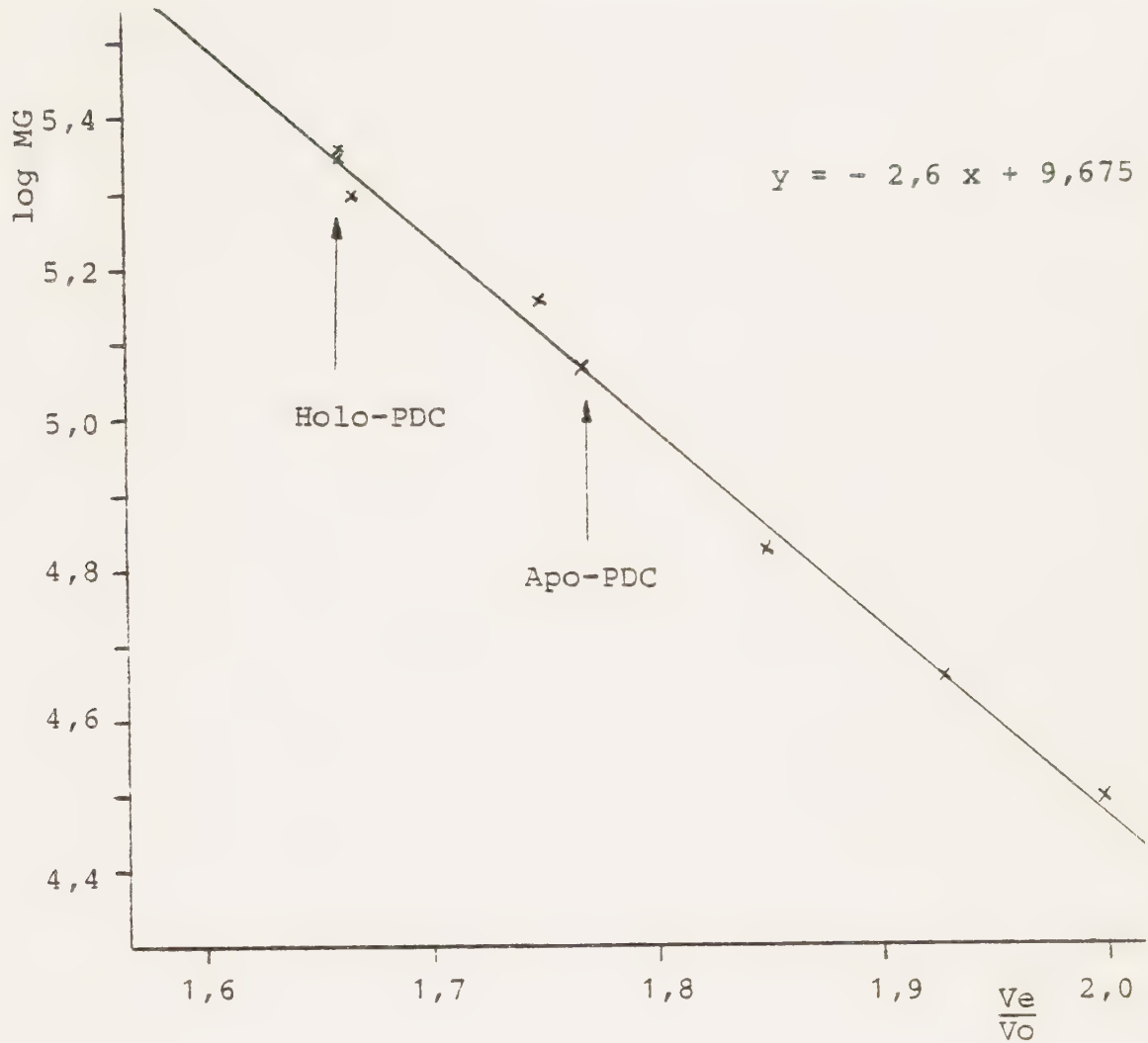


Abb. 21: Referenzgerade der Molekulargewichtsbestimmung von Holo- und Apoenzym nach Whitaker⁶⁶ durch Gelfiltration in Sepharose 6B. Säule 90 cm lang, Durchmesser 2 cm, Betthöhe 60 cm. Elutionsflüssigkeit 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,8, Elutionsgeschwindigkeit 20 ml/h.

Als Mittelwert von 5 Molekulargewichtsbestimmungen in Sepharose 6B ergab sich ein Molekulargewicht von 242.000 für das PDC-Holoenzym und 119.000 für das PDC-Apoenzym. Da nur 5 Werte vorlagen, wurde auf eine statistische Beschreibung des Mittelwertes verzichtet. Bei den Molekulargewichtsbestimmungen des Holoenzym wurden zwei "Ausreißer" festgestellt, die nicht in die Ermittlung des Mittelwertes einbezogen wurden. Das Molekulargewicht des Holoenzym lag dabei bei ca. 180.000. Das Apo-Enzym wurde jedoch auch hier entsprechend einem Molekulargewicht von 120.000 eluiert. Möglicherweise sind die Ausreißer auf Fehler bei der Erstellung der jeweiligen Referenzgeraden zurückzuführen. Der obere Bereich der Referenzgerade ist nur durch β -Amylase und Katalase abgesichert. Auch die Katalase zeigte häufig ein überraschendes Elutionsverhalten. Wiederholt wurde ein Elutionsvolumen gefunden, das etwa einem Molekulargewicht von 180.000 (3 Untereinheiten?) entsprach. Bemühungen weitere Referenzproteine mit gut definierten Molekulargewichten über 200.000 zu erhalten scheiterten. Transferin, das von Boehringer Mannheim empfohlen wird (Molekulargewicht 450.000), zeigte bei wiederholten Versuchen ein Elutionsvolumen, das einem Molekulargewicht von ca. 220.000, also der Hälfte des zu erwartenden Wertes, entsprach, und wurde deshalb nicht eingesetzt.

3.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen.

Die Versuche zur Molekulargewichtsbestimmung der PDC aus Bierhefe ergaben für die Untereinheit nach SDS-Denaturierung ein Molekulargewicht von 61.000, für das Apoenzym ein Molekulargewicht von 119.000 und für das Holoenzym ein Molekulargewicht von 242.000.

Damit muß, im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, von 4 Subunits für das Holoenzym der PDC ausgegangen werden, während im Apoenzym offensichtlich 2 Subunits kombiniert bleiben.

Nach Beendigung des praktischen Teils dieser Untersuchungen haben Gounaris et al.⁶⁷ ähnliche Befunde auch für die Bäckerhefe-PDC vorgelegt und damit ihre bisherigen Aussagen¹⁸ revidiert.

Ebenfalls nach Beendigung des praktischen Teils dieser Untersuchungen legten Oba und Uritani³⁴ die Ergebnisse von Untersuchungen der PDC aus Süßkartoffeln vor.

Demnach beträgt auch hier das MG für das Holoenzym 240000 und für die, nach SDS-Denaturierung gewonnenen, Untereinheiten 60000.

3.2.0. Bruttoaminosäurenzusammensetzung der PDC.

Auf der Basis der von Ullrich⁷ vorgenommenen Aminosäurenanalysen wurde, ausgehend von 4 Subunits, die Bruttoaminosäure-Zusammensetzung der Hefe-PDC erneut errechnet. Das Ergebnis ist in Tabelle 14 wiedergegeben. Die von Ullrich für diese Analysen eingesetzte PDC enthielt wohl sicher noch Spuren aktiver Proteasen. Die Subunitketten des Enzyms dürften deshalb eine Reihe von Spaltstellen aufgewiesen haben. Nach den unter 2.3.1. wiedergegebenen Ergebnissen der Untersuchung von proteasehaltigen PDC-Präparaten kann jedoch davon ausgegangen werden, daß die Tertiärstruktur der PDC trotz der Spaltstellen erhalten blieb, also komplette Ketten in die Aminosäureanalyse eingebracht wurden. Es bestand deshalb keine Veranlassung die von Ullrich durchgeführten Analysen zu wiederholen.

N (Zahl je Kette)	Amino- säure	R (Restge- wicht)	N x R	berechn. Mol-%	gefund. Mol-%
58	Asp	115.10	6,676	10.30	10.36
41	Thr	101.12	4,146	7.28	7.22
27	Ser	87.09	2,351	4.80	4.81
53	Glu	129.13	6,844	9.41	9.48
27	Pro	97.13	2,623	4.80	4.75
44	Gly	57.06	2.511	7.81	7.75
55	Ala	71.09	3,910	9.77	9.74
5	Cys	103.15	516	0.89	0.85
44	Val	99.14	4,362	7.82	7.85
11	Met	131.21	1,443	1.95	2.02
36	Ile	113.17	4,074	6.39	6.39
54	Leu	113.17	6,111	9.59	9.63
16	Tyr	163.19	2,611	2.84	2.85
23	Phe	147.19	3,385	4.09	4.09
8	Trp	186.23	1,490	1.42	1.42
35	Lys	128.19	4.487	6.22	6.18
12	His	137.15	1,646	2.13	2.12
14	Arg	156.21	2,187	2.49	2.49
+ 1	HOH	18.02	+ 18 (für endständige Reste)		
+ 41 w-Amidgr.		-1.00	- 41 (geschätzt f. IEP = 5.3)		
563	109		61 350 (gef. 61 000 ± 3000		
Gesamtzahl	Mittl. Restgewicht		Kettengewicht		

Tab. 17: Wahrscheinlichste Aminosäuren-Zusammensetzung der PDC-Subunit auf der Basis der Aminosäuren-analyse von Ullrich et al.⁷ und eines Molekulargewichtes von 61.000 ± 3000.

3.3.0. IEP der PDC.

Ludewig und Schellenberger³⁵ hatten den IEP der Holo-PDC zu 5,8 bestimmt und damit den Wert bestätigt, den Katsuma et al.⁶⁸ schon 1969 veröffentlicht hatten. Diese Befunde wurden zunächst mit nach den LKB "Application notes"⁶⁹ selbst hergestellten Dünnschichtplatten aus Polyacrylamidgel in den pH-Bereichen 4,5 - 6,5, später auch mit den Ampholine^R PAGplates der Firma LKB, in einem pH-Bereich von 3,5 - 9,5 überprüft.

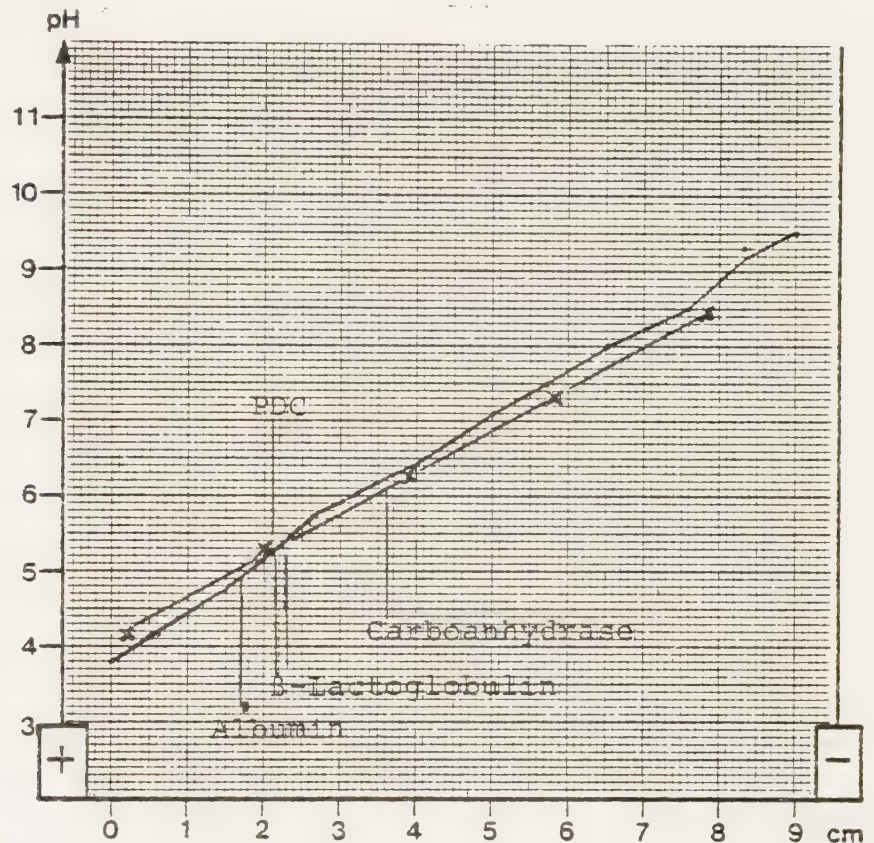
Als Marker-Proteine wurden β -Lacto-Globulin aus Milch, Rinderalbumin und Carboanhydrase verwendet. Folgende IEPs für diese Proteine wurden der Literatur entnommen⁷⁰:

Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	6,18
Albumin (Rinderserum)	4,97
β -Lacto-Globulin (Milch)-A	5,35
β -Lacto-Globulin (Milch)-B	5,46

Rinderalbumin ergab häufig eine breite, verschmierte Bande im Bereich um pH 5. Da die Zuordnung schwierig war, wurde später auf den Einsatz von Albumin völlig verzichtet.

Im folgenden ist ein typisches Protokoll einer IFPAG auf einer Ampholine^R PAGplate wiedergegeben. Es wurde abweichend von den allen PAGplates vom Hersteller mitgegebenen Anweisungen, nur ca. 60 Minuten statt 90 Minuten elektrofokussiert. Dabei wurde eine maximale Stromstärke von 40 Milliampere anstatt der in den Vorschriften angegebenen 50 Milliampere, angewendet. Wurden die Arbeitsbedingungen entsprechend den Herstellerangaben gewählt, erwärmten sich die Platten trotz Kühlung zu stark. Das aufgebrachte Eiweiß denaturierte oder die Proteinbanden zeigten sich als Wellenlinien, die nicht zuzuordnen waren. Die durch Ausstechen von Gelstückchen bestimmten pH-Gradienten

wichen jeweils nur wenig von den vom Hersteller und den selbst mittels Oberflächenelektrode bestimmten Gradienten ab (vgl. Abb. 22). Die IEPs der Marker-Proteine entsprechend den selbsterstellten Referenzgeraden stimmten bei einer Streubreite von $\pm 0,05$ mit den Literaturangaben⁷⁰ überein.



Electrofocusing data

Cooling plate
thermostated at

10 °C

pH measured at

10 °C

Time (min)	Voltage (V)	Current(mA)	Power(W)
0	200	40	
10	280	40	
20	440	40	
30	700	40	
40	1000	34	
50	1000	22	
60	1000	20	
90			

Abb.22: Protokoll und Referenzgerade einer IEPAG auf einer Ampholine^R PAGplate Lot-Nr. 678-747 der Fa. LKB. pH-Bereich 3,5 bis 9,5. Referenzgerade des Herstellers (—) und durch Ausstechen von Gelstückchen selbsterstellte Referenzgerade (x—x).

Der Mittelwert aus insgesamt 8 IFPAGs , 4 davon auf selbst hergestellten Platten, 4 auf Ampholine^R PAGplates, betrug 5,3 bei einer Streubreite von $\pm 0,05$. Ab der Fraktion 14 einer Sephadex-G-200 Gelfiltration nach Ullrich zeigte sich immer auch entsprechend dem Bild in der SDS-PAGE, eine Begleitbande. Der IEP dieses Proteins (Molekulargewicht der Subunit 48.500 in der SDS-PAGE) wurde zu pH 5,2 ($\pm 0,05$) bestimmt.

Auffallenderweise erwies sich die PDC in der IFPAG häufig uneinheitlicher als in der SDS-PAGE. Es fanden sich häufig Begleitproteine, die besonders bei den nach Ludwig und Schellenberger dargestellten Präparaten im Bereich 5,6 bis 6,0 diffuse, verschmierte Banden ergaben. Die folgende Abbildung zeigt das typische Bild der IFPAGEiner Fraktion 16 aus einer Sephadex G-200 Gelfiltration nach Ullrich:

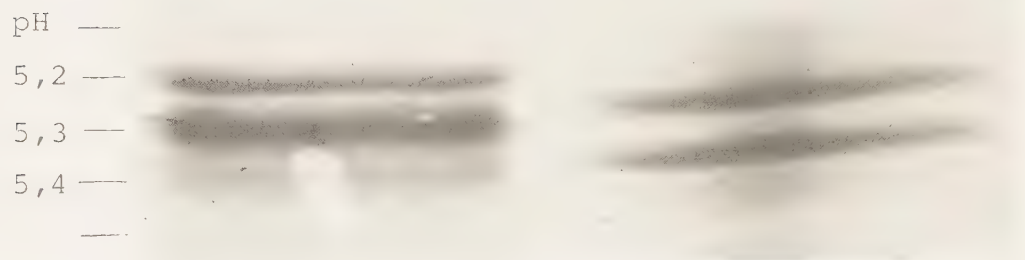


Abb. 23 : IFPAG der Fraktion 16 einer Sephadex G-200 Gelfiltration von Roh-PDC. PDC-Probe links, β -Lactoglobulin mit den Banden A und B als Referenzenzym rechts.

Der von Ludewig und Schellenberger³⁵ und anderen⁶⁸ gefundene IEP von 5,8 konnte demnach nicht bestätigt werden. Interessant ist, daß erste Versuche, den IEP der PDC zu bestimmen, schon 1939 von Melnick und Stern⁴⁴ unternommen wurden. Sie fanden in der einfachen Apparatur nach Michaelis⁷¹ einen Wert von 5,1.

4.0.0. Darstellung von BrCN-Spaltpeptiden der PDC.

Nachdem PDC hoher Reinheit zur Verfügung stand, sollte zum Abschluß dieser Arbeit versucht werden, einen gangbaren Weg zur Aufklärung der Primärstruktur der PDC aufzuzeigen. Diese orientierenden Versuche sollten nachfolgenden Untersuchern den Einstieg in die Arbeiten erleichtern:

Bei der Größe der Subunits mußte zunächst versucht werden, das Protein in eine definierte Anzahl von trennbaren Spaltpeptiden zu zerlegen. Seit den Arbeiten von Gross und Witkop⁷² gilt Bromcyan als Mittel der Wahl, um große Moleküle für Sequenzanalysen vorzubereiten oder um Ausgangsmaterial für weitere, z.B. enzymatische Hydrolysen zu gewinnen. Zunächst sollten deshalb Bromcyan-Spaltpeptide der PDC dargestellt werden.

4.1.0. Spaltung der PDC mit BrCN.

Die BrCN-Spaltung der nach 2.4. gereinigten PDC erfolgte nach Glossmann und Bode⁷³. Nach der Aminosäureanalyse⁷ (vgl. auch 3.2.0.) enthält die

PDC-Subunit 11 Methionine. Es konnten also 12 Spaltpeptide erwartet werden, eine Anzahl, deren Trennung aus dem Spaltpeptidgemisch und Reinigung, als Vorbereitung für weitere Untersuchungen, noch möglich schien.

Die gewonnenen PDC-Spaltpeptide waren in keinem der üblichen Puffer oder in organischen Lösungsmitteln löslich. Selbst in verdünnter Ameisensäure unter einer Konzentration von 50%, in konzentrierter Essigsäure und konzentriertem Ammoniak blieben Rückstände. Die schlechte Löslichkeit schränkte die Trennungsmöglichkeiten stark ein.

4.2.0. Dünnschichtchromatographie der BrCN-Spaltpeptide

Versuche, eine Auftrennung in der Dünnschicht-Chromatographie auf DC-Alufolien Kieselgel verschiedener Porengröße mit 50%iger Ameisensäure als Fließmittel zu erreichen, scheiterten. Die Entwicklung mit Ninhydrin-Sprühareagenz ergab eine breite, verschmierte Front. Die Verwendung von Kieselgelen mit Zusatz von Fluoreszenz-Indikator F_{254} erwies sich als unmöglich, weil 50%ige Ameisensäure die Fluoreszenz löschte.

4.3.0. Harnstoff-IFPAG der BrCN-Spaltpeptide

Das Verfahren nach Epstein und Wolf⁷⁴ wurde im analytischen Maßstab als Semi-Mikromethode (Röhrchen: 75 x 3 mm) und Makromethode (Röhrchen: 75 x 6 mm) durchgeführt. Die Zahl der Banden war bei verschiedenen Batches von Spaltpeptiden unterschiedlich hoch. Sie war jedoch immer größer als 12. Die Differenzierung war zuweilen schwierig, weil die Banden ziemlich verzerrt waren, möglicherweise wegen nicht homogener Geldichte oder nicht gleichmäßiger Ausbildung des pH-Gradienten. Solche Beobachtungen sind vor allem bei IFPAGs ohne Harnstoffzusatz bekannt⁷⁵.

Außerdem erschwerte die starke Background-Färbung der dichten Gele, die sich auch durch mehrwöchiges Entfärben in Entfärbelösung nach Weber und Osborn¹⁶ nicht aufhellen ließ, die genaue Identifizierung der Banden.

Zur Verbesserung der Darstellbarkeit der Gele wurden verschiedene in der Literatur vorgeschlagene Färbefahrverfahren im Vergleich ausprobiert (vgl. C.2.6.0.).

Als Resultat dieser vergleichenden Untersuchungen wurde bei IFPAGs und PAGEs in dichten Gelen das Färbefahrverfahren nach Blakesley und Boezi⁷⁶ eingesetzt, das auch die Sichtbarmachung schwacher Banden ermöglichte, wenn auch eine gewisse Background-Färbung der Gele in Kauf genommen werden mußte.

Bei der Darstellung der Bromcyan-Spaltpeptide in der Harnstoff-IFPAG schwankte, wie oben angegeben, die Zahl der Banden zwischen 12 und 18. Damit steht sie im Widerspruch zu der aus der Zahl der Methionine zu erwartenden Spaltpeptid-Anzahl von 12.

Zur Erklärung dieser Beobachtung bieten sich eine Reihe von Möglichkeiten an. Die einfachste ist, daß die bei der IFPAG benutzten Trägerampholine, von der Zusammensetzung selbst Polyamino-polycarboxysäuren, sich bei der IFPAG wie Peptide benehmen und schließlich sogar mit den verwendeten Proteinfarbstoffen unter artifizierlicher Bandbildung reagieren. Dazu finden sich auch Hinweise in der Literatur⁷⁷.

Auch von Protein-Ampholine-Komplexen, die sich in der IFPAG als Artefakte äußern können, wird berichtet^{78,79,80}. Während letztere aufgrund der hohen Harnstoffkonzentrationen in den hier beschriebenen Versuchsansätzen kaum eine Rolle spielen dürften, ist die

Bildung von Ampholine-Farbstoffkomplexen nicht ohne weiteres auszuschließen. Die Gele wurden deshalb alternativ vor dem Färben 24 Stunden in 50%igem Methanol gehalten, das mehrfach ausgetauscht wurde, um die Ampholine zu entfernen⁸¹. Zusätzlich wurde die Färbung bei 60°C durchgeführt. Vesterberg⁸² und Söderholm et al.⁸³ hatten diese Färbebedingungen vorgeschlagen, um der Ampholine-Farbstoff-Komplexbildung vorzubeugen. Alternativ wurden die Gele auch in 10%iger TCA fixiert, bevor sie gefärbt wurden. Die Fixierung in TCA führt ebenfalls zu einer Entfernung der Ampholine⁸⁴. Eine Verminderung der Bandenzahl der PDC-Bromcyan-Spaltpeptide in der Harnstoff-IFPAG ergab sich durch diese Maßnahmen nicht.

Es ist anzunehmen, daß trotz der hohen Harnstoffkonzentrationen in der Harnstoff-IFPAG keine völlig homogene Entfaltung der Spaltpeptide erfolgt, sondern gleiche Peptide in unterschiedlichen Konfigurationen vorliegen können. Daraus können durch unterschiedliche Exposition von geladenen Gruppen insgesamt unterschiedliche IEPs für gleiche Peptide resultieren, die zu einer Bandenvermehrung in der IFPAG führen. Das gleiche Resultat könnte auch eine teilweise Aggregation der Peptide bringen. Der Beweis für diese Hypothese wurde hier nicht mehr angetreten. Er müßte zum Beispiel in einer Harnstoff-IFPAG, gefolgt von einer SDS-Harnstoff-PAGE in der zweiten Dimension, wie von Epstein und Wolf⁷⁴ beschrieben, gut möglich sein. Darüberhinaus ist auch nicht auszuschließen, daß durch unvollständige Spaltung Peptide teilweise noch verbunden sind und es dadurch zu einer Bandenvermehrung kommt.

Schließlich wurde auch in die Überlegungen einbezogen, daß BrCN möglicherweise nicht nur Peptidbedingungen am Methionin, sondern auch an anderen Aminosäuren gespalten haben könnte. Bis jetzt wurden solche Beobachtungen allerdings nur unter spezifischen Versuchsbedingungen gemacht. So spaltet BrCN in Gegenwart von Heptafluorbuttersäure, z.B. auch Peptidbindungen am Tryptophan⁸⁵. Abbildung Nr. 22 zeigt ein Gel mit den PDC-Bromcyan-Spaltpeptid-Banden nach Harnstoff-IFPAG. Darunter findet sich der entsprechende pH-Gradient, der die Lage der isoelektrischen Punkte der einzelnen Banden zeigt.

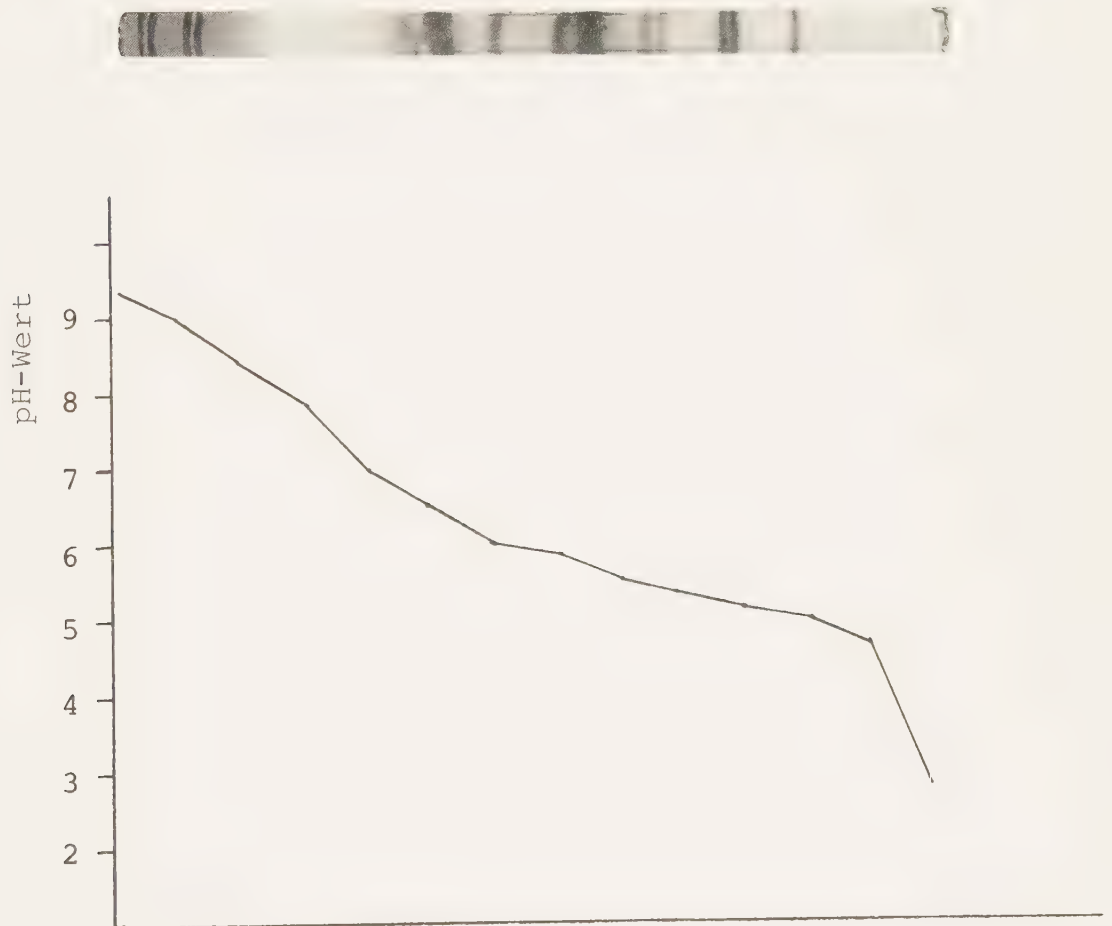


Abb. 24: Gel mit PDC-Bromcyan-Spaltpeptid-Banden nach Harnstoff-IFPAG in 160 x 9 mm Röhrchen.
—— pH-Gradient in einem parallel bei der IFPAG mitgeführten Gel, nach Schneiden und Eluieren bestimmt.

4.4.0. SDS-PAGE der BrCN-Spaltpeptide.

Die Spaltpeptide lösen sich in Pufferlösungen mit 0,1% SDS-Zusatz. Es bot sich deshalb die Darstellung der BrCN-Spaltpeptide in der SDS-PAGE an. Versuche wurden in 5%, 10% und 15%igen Gelen durchgeführt. In allen Fällen zeigte sich eine breite verschmierte Bande im Molekulargewichtsbereich um 25.000 bis 30.000. In 10%igen, vor allem in 15%igen Gelen war noch eine schwache, höhermolekulare Bande zu sehen. Die mehrmalige Wiederholung mit anderen Spaltpeptid-Chargen ergab kein reproduzierbares Bild. Offensichtlich bilden die Spaltpeptide, trotz der MeSH-Zugabe, Aggregate, die in der SDS-PAGE gemeinsam wandern. Auch durch Carboxymethylierung, die modifiziert nach Crestfeld et al.⁸⁶ durchgeführt wurde oder durch Oxidation mit Perameisensäure⁷⁴ konnte die Auflösung in der SDS-PAGE nicht verbessert werden.

4.5.0. Harnstoff-SDS-PAGE der BrCN-Spaltpeptide.

Entsprechend dem Verfahren von Swank und Munkres⁸⁷ wurde dann versucht, die BrCN-Spaltpeptide der PDC in einer SDS-Harnstoff-PAGE zu trennen. Von den untersuchten Gelen eigneten sich am besten Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 12% und einer Bis-Konzentration von 0,9%. Es zeigten sich breite, diffuse Banden, die nicht einwandfrei differenziert werden konnten. Eine Schärfung der Banden konnte auch durch ein Sammelgel von 0,8 cm Länge, einer Acrylamid-Konzentration von 5% und einer Bis-Konzentration von 0,2% nicht erreicht werden. Auch hier konnte die Carboxymethylierung⁸⁶ oder die Oxidation mit Perameisensäure⁷⁴ die Auflösung nicht verbessern.

5.0.0. Vorversuche zur Trennung der BrCN-Spaltpeptide.

Die Zahl der Spaltpeptide und ihre offensichtliche Neigung zur Aggregation machen es schwierig, die Peptide in ausreichenden Mengen zu isolieren, um eine weitere Charakterisierung oder gar Sequenzierung vornehmen zu können.

Die folgenden Versuche dienten dazu, einen gangbaren Weg zur Vortrennung der Spaltpeptide aufzuzeigen, um die spätere Isolierung zu erleichtern. Die Effizienz der versuchten Trennungen wurde jeweils durch Harnstoff-SDS-PAGES in Röhrchen der Abmessung 75 x 0,5 mm untersucht. Zum Einsatz kamen Gele mit einer Konzentration von 12% Acrylamid und 0,9% Bis.

5.1.0. Gelfiltration der BrCN-Spaltpeptide der PDC.

5.1.1. Gelfiltration mit SDS-haltigem Elutionspuffer

Zunächst wurde versucht, die Spaltpeptide durch Gelfiltration über Sephadex G-100 mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer von pH 6,8, der 0,1% SDS enthielt, als Elutionsflüssigkeit zu trennen. Dazu waren 100 mg des Lyophilisats der PDC-Spaltpeptide in 2 ml des gleichen Puffers, der allerdings 1% SDS enthielt, gelöst und auf eine Säule (70 x 2 cm, Betthöhe 50 cm) aufgebracht worden. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 20 ml/h. Die Peptide wurden in einem Peak eluiert. Ein kleiner Vorpeak zeigte in der SDS-Harnstoff-PAGE die gleiche, breite, diffuse Bande wie der Hauptpeak. Offensichtlich verhinderte die starke Aggregation der Peptide die Trennung nach dem Molekulargewicht. Versuche, mit einem Elutionspuffer, dem Harnstoff (8 M) zugesetzt worden war,

scheiterten, weil die Säulen sehr schnell verstopften.

5.1.2. Gelfiltration der maleylierten BrCN-Spaltpeptide

Daraufhin wurde versucht, die Spaltpeptide nach Maleylierung durch Gelfiltration zu trennen. Die Maleylierung wurde nach Butler et al.⁸⁸ vorgenommen. Die Spaltpeptide gingen dabei in Lösung. Ca. 3 ml dieser Lösung (Spaltpeptidkonzentration ca. 15 mg/ml) wurden auf eine Säule (60 x 1,5 cm, Betthöhe 40 cm), gefüllt mit Sephadex G-50 medium aufgebracht. Es wurde mit 0,1 M Pyrophosphatpuffer pH 9 eluiert (Elutionsgeschwindigkeit 20 ml/h). Es zeigten sich neben dem Peak der Maleinsäure noch 2 Peaks. Die Fraktionen der beiden Peaks wurden jeweils gepoolt, durch Versetzen mit Ameisensäure auf pH 3,5 gebracht und über Nacht bei 37°C demaleyliert. Anschließend wurden die Pools gefriergetrocknet. In der SDS-Harnstoff-PAGE zeigten sich einige Banden und wieder breite diffuse Zonen.

Die Lage und Intensität der Banden deutete auf Unterschiede in der Peptidzusammensetzung der beiden Peaks, doch blieb das Ergebnis unbefriedigend. Auch durch Wahl anderer Gele (Sephadex G-25 medium, Sephadex G-100 und Sepharose 6B) verbesserte sich die Auftrennung nicht. Auch hier verhindert offensichtlich eine starke Aggregation eine bessere Auftrennung der Peptide.

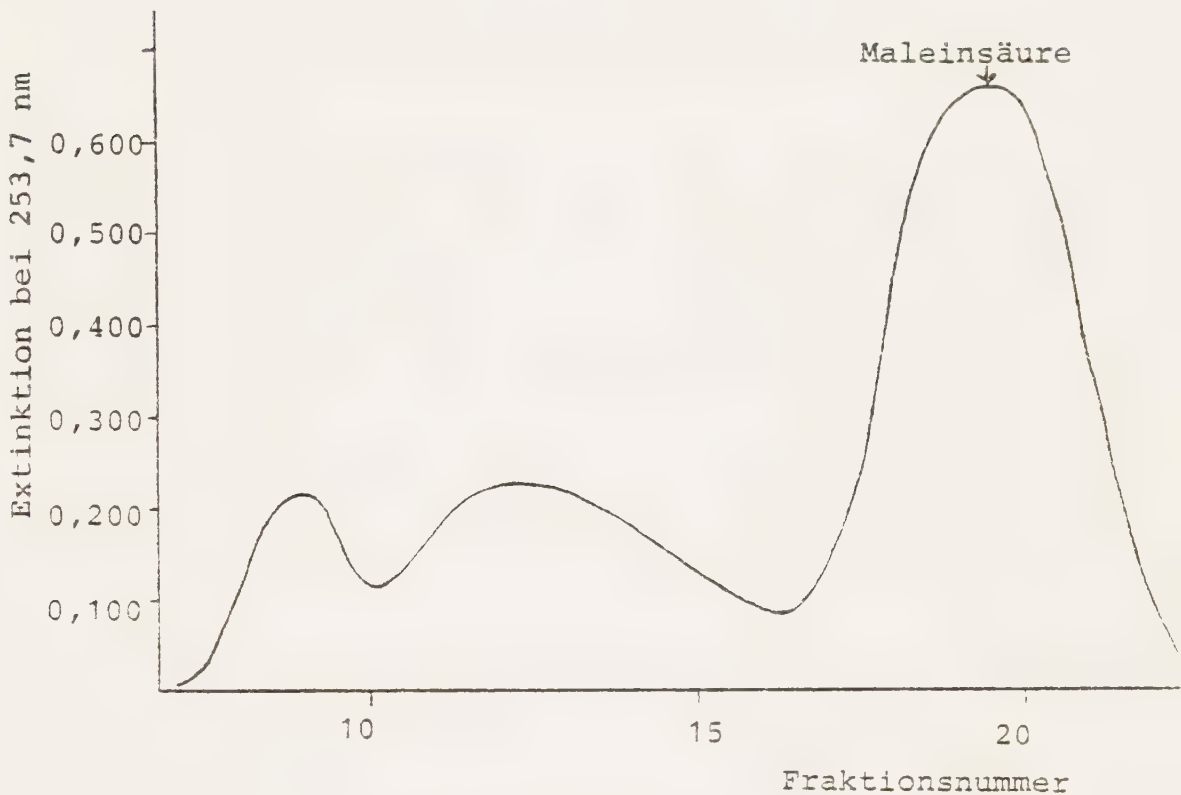


Abb. 25: Elutionsprofil einer Filtration maleylierter PDC-Spaltpeptide über Sephadex G-50 medium. Säulenmaße 70 x 2 cm, Betthöhe 50 cm, Elutionspuffer 0,1 M Natriumpyrophosphat pH 9, Elutionsgeschwindigkeit 20 ml/h, Fraktionsvolumen 3,5 ml.

5.1.3. Gelfiltration der BrCN-Spaltpeptide mit 50%iger Ameisensäure als Elutionsflüssigkeit.

Daraufhin wurde versucht, die Peptide durch Gelfiltration mit 50%iger Ameisensäure als Elutionsflüssigkeit zu trennen. Dazu wurde eine Säule (70 x 1,5 cm, Betthöhe 60 cm) mit Sephadex G-100 gefüllt und ca. 6 Stunden mit

50%iger Ameisensäure gespült. Die PDC-Spaltpeptide wurden in 70%iger Ameisensäure gelöst (15 mg/ml) und 3 ml der Lösung auf die Säule aufgebracht. Es wurde mit 50%iger Ameisensäure eluiert (10 ml/h).

Es zeigten sich 3 Peaks, die nach Poolen der einzelnen Fraktionen und Gefriertrocknen in der SDS-Harnstoff-PAGE untersucht wurden. Sie zeigten deutliche Unterschiede in der Bandenzusammensetzung, es war aber auch hier eine klare Differenzierung aller Banden nicht möglich, weil sie teilweise zu breiten, diffusen Zonen verschmolzen. Es hat also eine Trennung stattgefunden, auch wenn einige Banden in allen drei Peaks zu finden waren.

Peak 1 enthielt offensichtlich noch größere Anteile ungespaltenes oder nur unvollständig gespaltenes Material. Neben der PDC-Bande wurden noch einige schwache Banden im MG-Bereich von 20000 - 50000 gefunden.

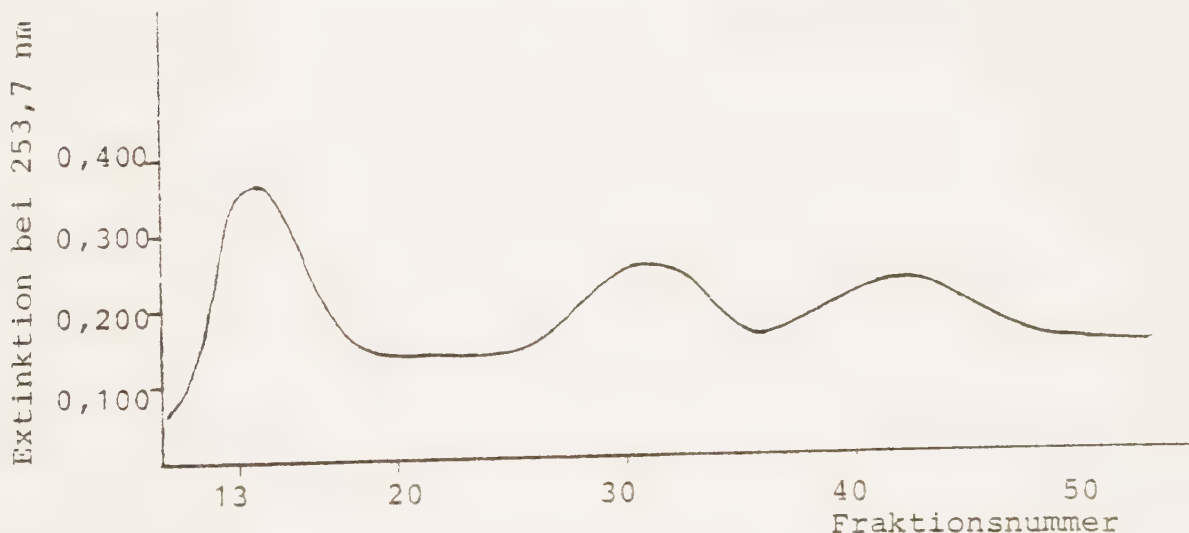


Abb. 26: Elutionsprofil der Filtration von Bromcyan-spaltpeptiden der PDC über Sephadex G-100 mit 50%iger Ameisensäure. Säulenmaße 70 x 1,5cm, Betthöhe 55 cm. Elutionsgeschwindigkeit 10 ml/h. Fraktionsvolumen 1,5 ml.

Das Elutionsprofil der Gelfiltrationen unterschied sich allerdings von Versuch zu Versuch, obwohl sich immer drei Peaks fanden. Das wenig reproduzierbare Bild hängt offensichtlich vom Schädigungsgrad des Sephadex-Gels durch die Ameisensäure ab. Bei dem Versuch, eine Säule mehrmals zu verwenden, löste sich das Gel soweit, daß es durch die Membran des unteren Adapters drang und in den Fraktions-sammler gespült wurde.

5.2.0. Ionenaustausch-Chromatographie der BrCN-Spalt-peptide.

Die Harnstoff-IFPAG hatte gezeigt, daß die einzelnen Spaltpeptide deutlich verschiedene IEPs haben. Eine Vortrennung in der Ionenaustausch-Chromatographie versprach deshalb Erfolg. Eine Säule wurde mit DEAE-Sephadex gepackt, das mit 0,1 molaren Tris/HCl-Puffer, pH 9, der Harnstoff (8 M) enthielt, äquilibriert worden war. 50 mg Spaltpeptid-Lyophilisat wurde gelöst in 3 ml des gleichen Puffers auf die Säule gebracht. Anschließend wurde mit dem gleichen Puffer eluiert. Es zeigte sich eine Auftrennung in 3 Peaks.

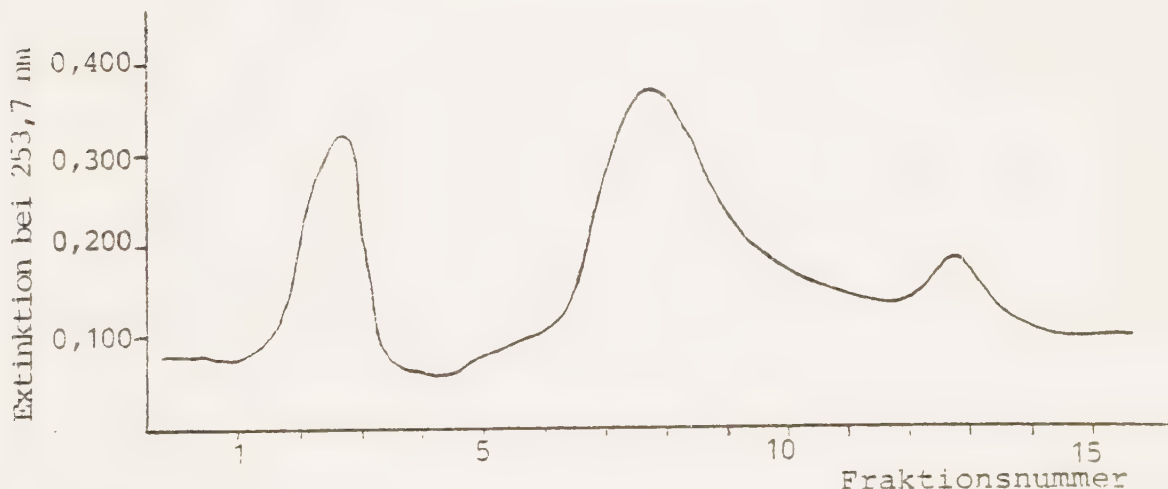


Abb. 27: Elutionsprofil der Chromatographie von Bromcyan-Spaltpeptiden der PDC an DEAE-Sephadex.

Elutionspuffer 0,1 M Tris/HCl, pH 9 mit 8 M Harnstoff. Elutionsgeschwindigkeit 10 ml/h. Fraktionsvolumen 50 Tropfen.

Die Fraktionen der Peaks wurden gepoolt und nach Umpuffern auf pH 6,8 (mit HCl) direkt in eine Harnstoff-IFPAGEingebracht. Die 3 Peaks zeigten verschiedene-Banden-Zusammensetzungen, wobei jetzt einzelne Gelbereiche (pH-Bereiche) ganz oder weitgehend frei von Banden waren. Wegen der hohen Salzkonzentration in dem Probenpuffer waren die Banden allerdings stark verzerrt und diffus.

5.3.0. Semipräparative Harnstoff-IFPAGE der BrCN-Spaltpeptide.

Aufgrund der guten Ergebnisse der Harnstoff-IFPAGE im analytischen Maßstab wurde die Adaption des Verfahrens an den semipräparativen Maßstab versucht. Es wurden Röhrchen der Abmessung 160 x 9 mm verwendet. Zum Einsatz kamen Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 10% und einer BIS-Konzentration von 0,3%. Die Gele wurden mit 30 - 40 mg Lyophilisat, gelöst in Probenpuffer, beladen. Versuche, jeweils 2 Gele einzusetzen, wobei nach Färbung und Entfärbung des einen Gels die Lage der Banden als Schablone für das andere zum Herausschneiden der Banden dienen könnte, scheiterten. In allen Gelen zeigten zumindest einige Banden eine starke Verzerrung, die das Schneiden nach Schablone unmöglich machten.

Alternativ hat sich folgendes Verfahren, auch im Sinne einer Probeneinsparung, bewährt: Die Gele wurden nach Entnahme aus dem Röhrchen ca. 1 Std. in 50%igem Methanol fixiert. Anschließend wurde das Gel ca. 10 Min. in eine Farblösung nach Weber und Osborn¹⁶ gebracht und danach sofort in eine Entfärbelösung. Dadurch färbte sich nur ein schmaler Proteinring in der Peripherie des Gels, der die Lage auch verzerrter Banden gut markierte. Nach

dem Herausschneiden der Bande konnte der stark gefärbte schmale äußere Rand abgeschnitten und das Peptid eluiert werden.

5.4.0. Versuche zur Bestimmung der Molekulargewichte der BrCN-Spaltpeptide.

Es war für diese Versuche erforderlich, geeignete Eichproteine für den Molekulargewichtsbereich unter 10000 zu finden.

Zunächst wurden nach Swank und Munkres⁸⁷ Myoglobin und Cytochrom C mit Bromcyan gespalten. Die Spaltpeptide, soweit sie den von Swank und Munkres⁸⁷ definierten zuzuordnen waren, sollten als Referenzproteine eingesetzt werden. Die Angaben über die Molekulargewichte wurden der Arbeit von Swank und Munkres⁸⁷ entnommen.

Die Versuche ergaben keine reproduzierbare Referenzgerade. Die Zahl der Spaltpeptide der Referenzproteine schwankte. Die Zuordnung zu bestimmten Molekulargewichten war zuverlässig nicht möglich.

Gute Ergebnisse wurden mit der Protein-Kollektion Combithek (Boehringer Mannheim) zur Molekulargewichtsbestimmung von Polypeptiden im Molekulargewichtsbereich von ca. 3.000 bis 22000 erzielt.

Zusätzlich wurden Rinderalbumin und Phosphorylase A als Referenzproteine eingesetzt, um den Verlauf der Referenzgeraden auch im höhermolekularen Bereich bis zu einem Molekulargewicht von 60.000 zu bestimmen.

Versuche, die Spaltpeptide direkt in eine SDS-Harnstoff-PAGE zur Bestimmung der Molekulargewichte einzubringen, scheiterten, weil die Banden zu wenig klar differenziert waren.

Es zeigte sich, daß vor diesen Arbeiten eine Vortrennung der Spaltpeptide erforderlich ist. Wenn die Fraktionen der Peaks aus der Gelfiltration (5.1.3.) oder Ionenaustauschchromatographie (5.2.0.) nach Lyophilisierung in eine SDS-Harnstoff-PAGE eingebracht werden, sind eine Reihe von Banden differenzierbar. Die Molekulargewichte einiger Banden lagen allerdings über 20000 , was auf unvollständig gespaltenes Material hindeutete. Allerdings finden sich auch hier noch verschiedene diffuse Zonen, besonders im Molekulargewichtsbereich zwischen 4000 und 12000 , die die Zuordnung der Banden erschweren. Insgesamt wurden mit Spaltpeptiden aus drei verschiedenen BrCN-Spaltungen Molekulargewichtsbestimmungen durchgeführt. Wie zu erwarten war, ergaben sich keine reproduzierbaren Resultate. Gerade im MG-Bereich zwischen 2500 und 17000 liegen die Banden sehr eng. Die Fehlerbreite des Verfahrens, die nach eigenen Beobachtungen in diesem niedrigen Molekulargewichtsbereich bei mindestens $\pm 15\%$ liegt, macht es dann unmöglich, die einzelnen Banden in verschiedenen SDS-Harnstoff-PAGEs klar zu identifizieren und Mittelwerte zu bilden. Auf die Wiedergabe von Resultaten der Molekulargewichtsbestimmungen wurde deshalb hier verzichtet. Vor weiteren Versuchen zur Charakterisierung der Spaltpeptide müssen sie weiter aufgetrennt werden. Die Harnstoff-IFPAG erwies sich in Vorversuchen dazu als geeignet. Zusätzlich werden zur Identifizierung noch zusammenhängender Spaltpeptide Endgruppenbestimmungen erforderlich sein.

5.5.0. Zusammenfassende Ergebnisse der Vorversuche zur Darstellung und Trennung der BrCN-Spaltpeptide.

Von den eingesetzten Verfahren ist die Darstellung der BrCN-Spaltpeptide in der Harnstoff-IFPAG zweifellos das schnellste und einfachste Verfahren. Obwohl Versuche mit Spaltpeptiden aus verschiedenen Spaltungen und verschiedenen Enzymchargen weitgehend reproduzierbare Ergebnisse brachten, ist beim Einsatz des Verfahrens zu beachten, daß möglicherweise gleiche Peptide verschiedene Banden bilden oder Peptide unterschiedlich miteinander aggregieren und dadurch ebenfalls eine Bandenvermehrung verursachen.

Die Ionenaustausch-Chromatographie in 8-molaren Harnstoff-Pufferlösungen eignet sich wohl am besten zur Vortrennung der BrCN-Spaltpeptide. Die Trennergebnisse lassen sich durch andere Ionenaustauscher- und Pufferwahl gegenüber den hier wiedergegebenen Vorversuchen sicher noch verbessern.

Zur weiteren Auftrennung von durch Ionenaustausch-Chromatographie vorgetrennten Spaltpeptiden eignet sich, wie Vorversuche zeigten, besonders die semi-präparative Harnstoff-IFPAG.

Da die Peptide entsprechend den isoelektrischen Punkten von der Säule eluiert werden, liegen die isoelektrischen Punkte der in einem Peak eluierten Peptide jeweils in einem relativ engen Bereich. Durch den Einsatz geeigneter Ampholine bei der Gelbereitung für die IFPAG können auch enge pH-Bereiche durch das Anlegen flacher pH-Gradienten so gespreizt werden, daß auch noch nahe zusammen-

liegende Banden durch Herausschneiden gut isoliert werden können. Durch Elution der Banden müßte genügend Protein für weitere Analysen im Mikromaßstab gewonnen werden können.

Eine Isolierung von PDC-Spaltpeptiden in größerer Ausbeute müßte in der LKB-Ampholine^R Elektrofokussierungs-Säule möglich sein. Durch geeignete Spreizung der pH-Gradienten sollten die Spaltpeptide weitgehend getrennt werden können. Natürlich muß auch hier die Dichtegradienten-Lösung in der Trennsäule, neben den Ampholinen und den Spaltpeptiden, Harnstoff in einer Konzentration von 8 M enthalten, um die Spaltpeptide in Lösung zu halten. Vorversuche mit diesem Verfahren wurden nicht durchgeführt, weil zu diesem Zeitpunkt eine geeignete Apparatur noch nicht zur Verfügung stand.

C. Materialien und Methoden

1.0.0. Materialien

Bierhefe (*Saccharomyces carlsbergensis*, Stamm Weihenstephan T-34) wurde von den Brauereien Ganter, Freiburg und Löwenbräu, München zur Verfügung gestellt.

Die übrigen Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Boehringer Mannheim:

Aldolase (Kaninchenmuskel)
Alkohol-Dehydrogenase (Hefe)
 β -Amylase (*Ipomoea batatas*)
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)
Combithek, Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung (MG 18000 - 300000)
Combithek, Eichproteine für SDS-Gelelektrophorese (MG 3000 - 22000)
Desoxyribonuclease I (Rinderpankreas)
Gesamteiweiß - Testsatz (Biuret)
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Kaninchenmuskel)
Glucose-Oxidase (Schimmelpilz)
Lactat-Dehydrogenase (Schweineherz)
 β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, freie Säure, Grad I
 β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, freie Säure, red. Dinatriumsalz
Phosphorylase (Kaninchenmuskel)
Pyruvat, krist. Mononatriumsalz
Pyruvat-Decarboxylase (Bierhefe)
Pyruvat-Kinase (Kaninchenmuskel)
Trypsin (Rinderpankreas)

Biorad Richmond, Calif.

Calciumphosphatgel nach Tiselius

Calbiochem, San Diego, Calif.:

Azocoll

Alumina C_γ Gel (aged) A grade

Fluka AG, Buchs, SG

N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin

Hoffmann La Roche, Basel

Thiaminpyrophosphat

LKB-Produkter AB, Bromma, Schweden:

Ampholine^R pH 3,5 - 10

pH 4 - 6

pH 5 - 7

Ampholine^R-PAG-Plates 3,5 - 9,5

Ultrogel

Metrohm AG, Herisau:

Eichpuffer

Pharmacia A.B., Uppsala, Schweden:

CM-Sephadex C-50

DEAE-Sephadex A-25

Dextranblau 200

Sephadex G-25 medium

G-50 medium

G-50 fine

G-75

G-100

G-200

Sepharose-6B

Riedel de Haen AG, Seelze, Hannover

Citronensäure p.A.

Carl Roth OHG, Karlsruhe:

2-Mercaptoäthanol

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Serva -Feinbiochemica, Heidelberg

Acrylamid

Ammoniumperoxidisulfat p.A.

Bromcyan, reinst

Bromphenolblau, Natriumsalz

Celite 545 pract.

Coomassie brilliant blau G-250, rein

Coomassie brilliant blau R-250, rein

Dowex 1 x 2 200 - 400 mesh (Cl-)

Hämoglobin lyophil., rein (Rind)

β -Lactoglobulin (Rind)

N,N'-Methylenbisacrylamid, reinst

Myoglobin (Pferd)

Myoglobin (Wal)

Ninhydrin p.A.

Riboflavin pharm.

Ribonuclease 5 x krist. (Pankreas)

Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA:

Pyruvat-Decarboxylase (Bierhefe)

Vega-Fox, Biochemicals, Tuscon, Az., USA

CBZ-L-Alanyl-L-phenylalanin

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

2.0.0. Methoden

Im folgenden werden nur Methoden beschrieben, die selbst entwickelt oder gegenüber der Literaturvorschrift modifiziert durchgeführt wurden.

Weiter werden Hinweise auf die verwendeten Geräte (-Systeme) gegeben.

Referenzen für die unverändert der Literatur entnommenen Vorschriften finden sich unter "B. Ergebnisse und Diskussion".

2.1.0. Proteinbestimmungen

Proteinbestimmungen wurden mit dem von Boehringer Mannheim angebotenen Biuret-Reagenz nach Weichselbaum⁸⁹ durchgeführt. Als Standard wurde der von Boehringer Mannheim angebotene Proteinstandard in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt.

Da die zu messenden Proteinkonzentrationen vorwiegend in einem Bereich von 0,5 bis 2 mg/100 ml lagen, sowie häufig Ammoniumsulfat enthielten, das bekanntlich die Biuret-Reaktion stört, wurde folgende Modifikation entwickelt:

Gearbeitet wurde dabei mit dem Eppendorf-Mikroliter-system.

Testansatz

Enzymlösung (-Suspension) 0,5 ml

Trichloressigsäure (40%) 0,2 ml

5 Minuten mischen (Eppendorf-Rotationsmischer 3300)

2 Minuten zentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge 3200)

Überstand mit Mikroliterpipetten sorgfältig abpipettieren.

Biuret-Reagenz 1,0 ml

30 Minuten mischen (Eppendorf-Rotationsmischer 3300)

In Halbmikroküvetten bei Hg 546 nm gegen das Biuret-Reagenz messen. (Eppendorf-Photometer, Typ 1101 M., Spalt 2,5 x 12 mm).

Das Verfahren gehorchte bis 3 mg/ml Protein dem Lambert Beerschen Gesetz. Bis zu dieser Konzentration konnte mit einem Faktor ($F = 7,2$) ausgewertet werden. Wurden, was selten vorkam, höhere Proteinkonzentrationen gemessen, mußten die Proben 1:2 oder 1:3 mit dem Puffer verdünnt werden, in dem das Protein jeweils gelöst war.

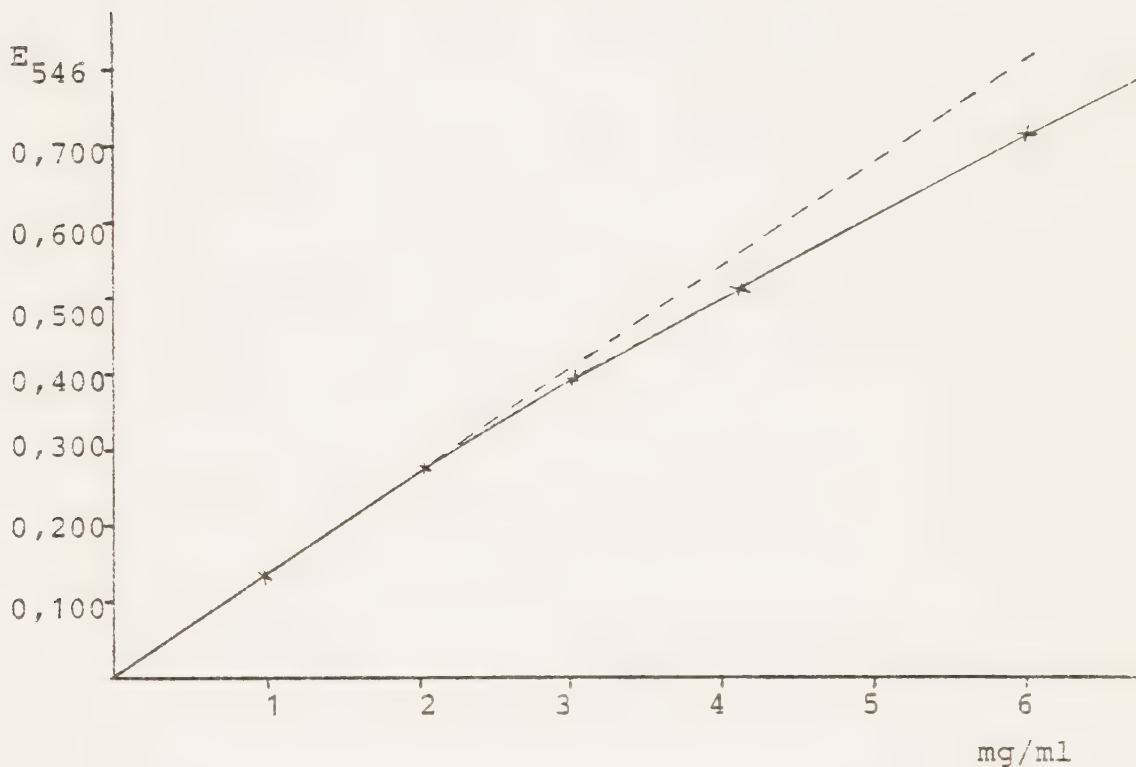


Abb. 28: —x—x—x—Referenzkurve der Biuretmodifikation zur Bestimmung von niedrigen Proteinkonzentrationen.
----- theoretische Referenzkurve bei über den gesamten Bereich erfüllten Lambert-Beerschen Gesetz.

Das Verfahren wurde auch durch Ammoniumsulfatkonzentrationen von 50% (w/v) nicht gestört, wo bei der herkömmlichen Biuret-Reaktion bereits um 50% falsch erhöhte Proteinkonzentrationen gefunden wurden. SDS-Konzentrationen von 2mg/ml zeigten ebenfalls keinen Einfluß. Die Präzision des Verfahrens ist mit Variationskoeffizienten von 2 bis 2,5% sehr gut.

2.2.0. Enzymaktivitätsbestimmungen

Die Messungen wurden im Eppendorf-Photometer 1101M durchgeführt.

Für kinetische Messungen war es mit einer temperierbaren Küvettenwechselautomatik ausgestattet (vgl. jedoch 2.2.1.). Registriert wurde im Eppendorf-Kompensationsschreiber 4412. Teilweise wurde auch der Eppendorf-Enzymrechner 6452 in Verbindung mit dem Drucker 6522 eingesetzt. In diesem Fall wurde das Photometer mit dem Automatic Cell Positioner 2705 ausgerüstet.

Zweipunkt-Messungen wurden in Hellma-Glasküvetten, kinetische Messungen in Sarstedt-Einmalküvetten durchgeführt.

2.2.1. Bestimmung von Proteaseaktivitäten

Protease-A-Aktivität

Die Protease-A-Aktivität wurde entsprechend der von Juni und Heym³⁹ angegebenen Modifikation des Verfahrens von Lenney⁹⁰ bestimmt. Die Messung erfolgte in Hellma-Quarz-Küvetten im Spektralphotometer DB von Beckman.

Protease-B-Aktivität

Protease-B-Aktivität wurde entsprechend den von Juni und Heym³⁹ angegebenen Verfahren bestimmt. Gemessen wurde bei 546 nm (Hg) im Eppendorf-Photometer.

Protease-C-Aktivität

Protease-C-Aktivität wurde nach Juni und Heym³⁹ bestimmt. Das Ninhydrin-Reagenz wurde entsprechend Lee et al.⁹¹ angesetzt.

Auf eine Standardisierung des Verfahrens mit einer L-Phenylalanin-Lösung bekannter Konzentration wurde verzichtet und die Extinktion bei 578 nm (Hg) pro mg Protein (30 Minuten Inkubationszeit) als Maß für die Protease-C-Aktivität genommen.

2.3.0. Antiproteolytische Maßnahmen

2.3.1. Zumischen von Hefekochsaft

Kochsaft von Hefe wurde im Verhältnis 1:5 zum Bierhefe-Mazerationssaft gerührt.

2.3.2. Erhitzung von Mazerationssaft bzw. Rohenzym.

Das Protein im Mazerationssaft bzw. Rohenzym wurde mit Ammoniumsulfat gefällt und mit 1 M Natriumphosphatlösung wieder aufgenommen. Anschließend wurde 30 Minuten bei 56°C erhitzt. Bei kleinen Proteinmengen wurde im Eppendorf-Inkubator, bei großen in einem Wasserbad der Firma Julabo, gearbeitet.

Anschließend wurde im Eisbad gekühlt und ausgefallenes Protein mit der Eppendorf-Zentrifuge 3200 bzw. der Vetter ZK-4 Kühlzentrifuge bei 15000 RpM abzentrifugiert.

2.3.3. Behandlung mit PMSF

34,8 mg PMSF wurden in 96%igem Äthanol gelöst und in Portionen von 0,01 ml unter vorsichtigem Rühren zur Proteinlösung getropft, bis das Konzentrationsverhältnis 1:20 erreicht war.

2.4.0. Säulenchromatographien

Alle Chromatographien wurden in kühlbaren Säulen der Firmen Pharmacia/Upsala oder Thoma/Freiburg durchgeführt. Der Betrieb der Säulen erfolgte mit Perpex-Peristaltik-Pumpen der Firma LKB (LKB-Produkte) AB, Bromma, Schweden).

In einzelnen Fällen (im folgenden vermerkt) wurde auch nur mit hydrostatischem Druck eluiert. Gradienten wurden mit Hilfe von 2 kommunizierenden Zylindern gemischt, von denen der mit der Perpex-Pumpe verbundene mit einem Magnetrührer (Magnetrührer RCH Janke und Kunkel, Staufen) ausgerüstet war.

Die Eluate wurden in einem Fraktionssammler der Firma LKB (Ultrorac 7000) aufgefangen, der in einer Colora-Kühltruhe (Colora-Meßtechnik, 7071 Lorch) auf 2 bis 6°C gekühlt wurde. Die Säulen wurden jeweils entsprechend den Vorschriften der Füllmaterialhersteller (vgl. Materialien) unter hydrostatischem Druck gepackt. Registriert wurde in einem 8300 Uvicord II UV-Absorptionsphotometer der Fa. LKB bei 253,7 nm.

2.5.0. Reinigung von PDC-Rohenzym

2.5.1. Gelfiltrationen

Die Gelfiltrationen mit Sephadex G-200, Sepharose 6B und Ultrogel wurden in Säulen der Abmessung 110 x 2 cm mit Adapter (V = 20 ml/h) durchgeführt. Aufgebracht wurden maximal 300 mg Protein (1 bis 1,5 g Rohenzym-Paste) in 0,05 M Phosphatpuffer von pH 6,8. Eluiert wurde mit dem gleichen Puffer.

2.5.2. Chromatographie an Calciumphosphatgelen

Die Gele wurden nach Keilin und Hartree³⁰ bzw. nach Tiselius et al.²⁸ präpariert oder das Fertigpräparat nach Tiselius von BioRad gekauft.

Säulen von 0,5 bis 1 cm x 20 bis 50 cm wurden mit dem Gel gepackt. Die Betthöhen lagen zwischen 15 und 30 cm. Zur Durchflußverbesserung wurden dem Gel im Mischungsverhältnis (Naßgewichte) 1:1,5 bis 1:3 Celite 545 oder sorgfältig gewaschene Cellulose zugesetzt. Die Säulen wurden ausschließlich unter hydrostatischem Druck eluiert (3 bis 15 ml pro Stunde je nach Durchflußeigenschaft des Gels). Eluiert wurde mit Phosphatpuffergradienten unterschiedlicher Steilheit (0,05 bis 0,5 M) und Ammoniumsulfatgradienten (10 bis 50% w/v).

2.5.3. Gradientenelution von mit Ammoniumsulfat in Gelen präzipitierter PDC.

Celite 545 als Trägermaterial.

Zu ca. 100 mg nach Ullrich dargestellter PDC, die in 100 ml 0,05 M Natriumphosphatpufferlösung von pH 6,8 gelöst war, wurden zunächst 15 g Celite 545 und Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 50% (w/v) zugegeben. Nach 30 Min. Rühren wurde eine Säule (1,5 x 30 cm) unter hydrostatischem Druck (Niveau-Differenz 20 cm) gepackt und anschließend 2 Stunden mit 0,05 M Natriumphosphatpufferlösung von pH 6,8, die 50% Ammoniumsulfatlösung (w/v) enthielt, gespült. Daraufhin wurden Gradienten verschiedener Steilheit, ausgehend von 0,05 M Natriumphosphatpufferlösung (pH 6,8) mit 50% (w/v)

Ammoniumsulfat und dem gleichen Puffer, sowie dem Puffer mit 10%, 15% und 20% Ammoniumsulfat (w/v) angelegt. Die Ammoniumsulfatlösungen waren vorher jeweils auf pH 6,8 eingestellt worden.

Es wurden jeweils 100 ml des Puffers mit 50%iger Ammoniumsulfatlösung und die korrespondierende Menge des zweiten zur Gradientenbildung herangezogenen Puffers eingesetzt.

Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 10 ml/h.

Sephadex-G50, -G75, -G100 als Trägermaterialien.

Die Gele wurden jeweils über Nacht in 2-molarer Ammoniumsulfatlösung gequollen.

Es wurden Säulen (30 x 1,5 cm) mit einer Betthöhe von 25 cm gepackt. Ca. 50 mg von nach Ullrich dargestellter PDC wurden, in 2 M Ammoniumsulfatlösung suspendiert, in die Gel-Oberfläche eingerührt. Anschließend wurde mit Ammoniumsulfat-Gradienten unterschiedlicher Steilheit eluiert ($v = 15$ ml/h).

Sepharose 6B als Trägermaterial

Die mit Sepharose 6B gefüllte Säule (30 x 1,5 cm, Betthöhe 25 cm) wurde ca. 8 Stunden mit 2 M Ammoniumsulfatlösung äquilibriert. Die PDC wurde in 2 ml 0,05 M Phosphatpufferlösung (60 mg Protein/ml Pufferlösung) über Adapter aufgebracht. Anschließend wurde 1 Stunde mit 2 M Ammoniumsulfatlösung nachgespült. Die im oberen Viertel des Gelbettes präzipitierte PDC wurde mit einem Gradienten, bestehend aus 680 ml 2 M und 740 ml 1 M Ammoniumsulfatlösung eluiert.

2.5.4. Adsorption an Alumina C_γ

Das Protein im Mazerationssaft bzw. Rohenzym wurde mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Nach Abzentrifugieren wurde in Aqua bidest. gelöst (15 mg/ml). Alumina C_γ wurde aus der Suspension abzentrifugiert (ca. 1 mg Alumina C_γ Trockengewicht per mg Protein) und die wässrige Lösung des Proteins zugegeben. Es wurde 30 Minuten vorsichtig gerührt und anschließend das Alumina C_γ abzentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverarbeitet.

2.5.5. Optimiertes Verfahren zur Darstellung von reiner PDC.

Nach Ullrich dargestelltes PDC-Rohenzym wird mit 40 millimolarer PMSF-Lösung in 95%igem Äthanol behandelt. Die PMSF-Lösung wurde im Verhältnis 1:20 zur Enzymlösung unter Rühren tropfenweise pipettiert.

Die PDC-Lösung wird dann, wie unter 2.5.3. beschrieben, mit einer Zonen-Präzipitation in einer mit Sepharose-6B gefüllten Säule vorgereinigt. Die PDC-haltigen Fraktionen (F 46 - F 68 bei einer Fraktionsstärke von 5 ml), im allgemeinen 120 bis 150 mg Protein, werden gepoolt, mit Ammoniumsulfat ausgesalzen, abzentrifugiert und in ca. 1,5 ml 0,05 M Natriumphosphatpufferlösung von pH 6,8 gelöst. Die Lösung wird erneut, wie oben beschrieben, mit PMSF behandelt und dann über eine mit Sepharose 6B gefüllte Säule (110 x 2 cm), Bett- höhe 90 cm, mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 20 ml per Stunde filtriert. Als Elutionsflüssigkeit dient 0,05 M Phosphatpufferlösung von pH 6,8.

2.6.0. Färbeverfahren zur Darstellung von Proteinbanden in Polyacrylamidgelen.

Zur Ermittlung des geeigneten Verfahrens wurden verschiedene Methoden im Vergleich ausprobiert. Dazu wurden gleiche Mengen von PDC-Bromcyan-Spaltpeptiden mit einer Harnstoff-IFPAG in Röhrchen der Abmessung 0,3 x 7,5 cm, die mit einem Gel der Zusammensetzung 12% Acrylamid und 0,9% Bis gefüllt waren (Gellänge 6 cm), getrennt. Eine Übersicht über die eingesetzten Färbemethoden und das Resultat findet sich in Tabelle 26. Nach Färbung entsprechend Weber und Osborn¹⁶ wurde durch mehrtägiges Stehenlassen der Gele in Reagenzgläsern entfärbt, die ca. 0,5 g Ionenaustauscher Dowex (Gegenion Cl Typ 1 x 2) enthielten. Alternativ wurde auch elektrophoretisch in der Apparatur, in der die Elektrophoresen durchgeführt wurden, entfärbt, wobei die Gele in Röhrchen verbracht wurden, die einen um etwa 1 mm weiteren Durchmesser hatten als die Elektrophoresenröhrchen und unten eingezogen waren.

Methode	Fixier- und Farblösung	Differenzierung	Ergebnis	
			Banden	Gel-Background
Weber und Osborn ¹⁶	0,25% CBB-R250 in Methanol/ Eisessig/Wasser (5/1/5)	Methanol/Essig- säure/Wasser (2/3/35)	+++	+++
Chrambach et al. ⁹²	0,25% CBB-R250 in 12,5% TCA	10%ige TCA-Lösung	+	-
Reisner et al. ⁹³	0,04% CBB-G250 in 3,5% Per- chlorsäure	-	++	- bis +
Malik und Berrie ⁹⁴	0,9% CBB-R250 in einer 12%igen Lösung von TCA in H ₂ O/2n H ₂ SO ₄ / 10 n KOH (10/10/2)	H ₂ O	+	-
Diezel, W., Kopper- schläger, G. ⁹⁵ und Hoffmann, E.	Fixierung in 12,5%iger TCA Färbung in 0,012 CBB-G250 in 12%iger TCA	5%ige Essigsäure	++	- bis +
Blakesley und Boezi ⁷⁶	0,09% CBB-G250 in einer 12%igen Lösung von TCA in H ₂ O/2n H ₂ SO ₄ / 10 n KOH /10/10/2)	H ₂ O	+++	+

Tabelle 18: Vergleich verschiedener Methoden zur Färbung von Peptiden in Polyacrylamidgelen.
+++ sehr stark gefärbt, ++ deutlich gefärbt, + schwach gefärbt, - keine Färbung.

2.7.0. PAGEs

Alle analytischen PAGEs erfolgten in Poly-analyst-Apparaturen der Firma Buchler/Fort Lee, New Jersey mit einem Kühlmantel und einem Aufnahmevermögen von 12 bzw. 18 Röhrchen. Es kamen Röhrchen der Abmessungen 75 x 5 mm, 75 x 3 mm und 120 x 6 mm zum Einsatz. Zur Stromspeisung diente als Netzgerät VoKam SAE 2761 von Shandon, Southern, GB.

Semiquantitative PAGEs wurden in einer im Institut gebauten Apparatur durchgeführt, die im Prinzip der Buchler-Apparatur entsprach, aber keinen Kühlmantel besaß. Elektrophoresen mit dieser Apparatur wurden deshalb ausschließlich im Kühlraum bei 4 - 6°C durchgeführt. Die Röhrchengröße betrug 160 x 9 mm. Die Stromspeisung erfolgte mit dem Netzgerät von Camag, Muttensz, BL, Schweiz (1200/1800 V).

Zum Eluieren einzelner Banden aus den Gelen wurden die Gele mit einer Rasierklinge zerschnitten. Eluiert wurde in Mikrogefäßen unter Schütteln in einem Eppendorf-Rüttler oder, in größeren Röhrchen, unter Schütteln auf einem IKA-Magnetrührer mit Schüttelaufsatz.

2.7.1. SDS-PAGE

Es wurde nach der Methode von Shapiro, Viñuela und Maizel¹⁵ entsprechend der von Weber und Osborn¹⁶ beschriebenen Modifikation vorgegangen. Dabei wurde mit Gelen folgender Zusammensetzung gearbeitet:

Acrylamid	Bis
15 %	0,4%
12 %	0,3%
7,5%	0,2%
5%	0,2%

Nach dem Aufbringen der Proben auf die Gele (mit Mikropipette) wurde zunächst eine Stromstärke von 3 mA per Gel angelegt. Anschließend, sobald die Proben in das Gel eingedrungen waren, wurde die Stromstärke auf 6 mA pro Röhrchen erhöht. Die Probenvorbereitung erfolgte zunächst nach Weber und Osborn¹⁶, später, nach Erkennung der Proteasenproblematik, wurden die Proben jeweils bei 96°C (Eppendorf-Inkubator) für mindestens 30 Minuten in 1%iger SDS-Lösung behandelt. Die Elektrophoresedauer variierte in Abhängigkeit von der Gelzusammensetzung von 4 bis 6 Stunden.

2.7.2. Harnstoff-SDS-PAGE

Das von Swank und Munkres⁸⁷ beschriebene Verfahren wurde eingesetzt.

Folgende Gele kamen zum Einsatz:

Acrylamid	Bis
5%	0,2 %
10%	0,3 %
12,5%	0,2 %
12,5%	0,9 %

Bei dem Versuch, Spaltpeptide in der SDS-Harnstoff-PAGE darzustellen, wurde auf den Gelen zusätzlich ein Sammelgel (0,8 cm hoch; Zusammensetzung: 5% Acrylamid und 0,2 Bis) polymerisiert. Üblicherweise wurde ein Strom von 3 mA per Röhrchen angelegt.

2.7.3. Diskontinuierliche PAGE

Zur Darstellung von nativer PDC wurde ein von Maurer¹⁹ angegebenes Trennsystem eingesetzt. Das Trenngel war auf einen pH-Wert von 7,5 gepuffert und hatte eine Acrylamid-Konzentration von 7,5% und eine Bis-Konzentration von 0,2%.

Das Sammelgel war auf pH 5,5 gepuffert und hatte eine Acrylamid-Konzentration von 2,5% und eine Bis-Konzentration von 0,6%.

Zunächst wurde das ca. 50 mm hohe Trenngel, dann darüber das 10 bis 15 mm hohe Sammelgel polymerisiert. Beide Gele wurden abweichend von Maurer mit dem Ammoniumperoxidisulfat/Temed-Katalysator-Gemisch polymerisiert. Als Elektrodenpuffer diente, wie bei Maurer angegeben, Diäthylbarbitursäure/Tris-Puffer von pH 7.

2.7.4. Kontinuierliche PAGE

Verwendet wurde ein Gel mit 5% Acrylamid und 0,2% Bis. Es wurde sowohl im analytischen (Röhrchen: 75 x 5 mm) wie semi-präparativen Maßstab (Röhrchen: 160 x 9 mm) gearbeitet. Das Gel wurde mit 0,2 M Tris/Phosphatpuffer von pH 6,8 angesetzt, der 1:5 verdünnt auch als Elektrodenpuffer diente. Polymerisiert wurde mit dem Ammoniumperoxidisulfat/Temed-System. Die PDC wurde in 0,02 M Tris-Phosphatpuffer von pH 6,8 gelöst und einige Stunden dagegen dialysiert, bevor die PDC-Lösung, mit Glycerin beschwert, in Konzentrationen von 0,5 bis 2,0 mg/ml auf die Gele aufgebracht wurde. Alternativ wurde die Enzymlösung auch über eine kurze, mit Sephadex G25 gefüllte Säule mit 0,02 M Tris-Phosphatpuffer als Elutionsflüssigkeit entsalzt. Die Gele wurden 1 Stunde bei 6 mA/Röhrchen (ca. 7,5 Volt) vorelektrophoresiert. Die Elektrophoresen wurden immer im Kühlraum bei 4 bis 8°C durchgeführt. Die Elektrophoresedauer betrug 3 Stunden (6 mA/Röhrchen).

2.8.0. IFPAGs

2.8.1. Dünnschicht-IFPAGs

Die IFPAGs wurden im LKB 2117-Multiphor durchgeführt. Die Kühlplatte, die als Träger für die Gele diente, wurde im Durchfluß mit den Kältethermostaten Ultra-Kryomat TK 30D der Fa. Lauda, Dr. Wobser KG, Lauda auf 10°C gekühlt.

Die Stromspeisung erfolgte durch das Netzgerät 1200/1800 V von Camag, Muttensz/Schweiz. Die Proben wurden in einer Konzentration von 1 bis 3 mg Protein/ml in 0,05 M Phosphatpuffer von pH 6,8 gelöst. Sie wurden entweder einige Stunden gegen diesen Puffer dialysiert oder durch Filtration über eine kurze, mit Sephadex G25 gefüllte, Säule entsalzt. Dabei diente der gleiche Puffer als Elutionsflüssigkeit. Die Proben wurden mit Filterpapierstückchen (Whatman-3M) von 6 x 10 mm auf die Gele aufgebracht. Dazu wurden die Filterpapierstückchen in die Probenlösung getaucht. Üblicherweise wurde jede Probe doppelt aufgebracht und zwar jeweils 1 cm oberhalb und unterhalb vom erwarteten pH-Wert des IEPs, so daß das Protein bei der Elektrofokussierung von zwei Seiten auf den IEP zulief. Die Verbindung zwischen Kathode und Gel wurde durch einen mit 1 M Natriumlauge, die zwischen Anode und Gel durch einen mit 1 M Ortho-Phosphorsäure getränkten Filterpapierstreifen hergestellt.

Dünnschicht-IFPAG mit selbstgegossenen Platten.

Die Gele wurden entsprechend der von LKB angegebenen Anleitung²¹ zwischen zwei Glasplatten polymerisiert. Vor Zugabe des Polymerisations-Katalysators wurde jeweils mit der Wasserstrahlpumpe 5 bis 10 Minuten entlüftet.

Folgende Gele kamen zum Einsatz:

pH-Bereich 3,5 bis 9,5

10 ml Acrylamid (29,1 g auf 100 ml Aqua-bidest)

10 ml Bis (0,9 g auf 100 ml Aqua bidest.)

29,9 ml Aqua bidest.

5 ml Glycerin

2,8 ml Ampholine^R pH 3 - 10

0,4 ml Ampholine^R pH 4 - 6

0,4 ml Ampholine^R pH 5 - 7

1,5 ml Persulfatlösung (1,5 g/100 ml Aqua bidest.)

pH-Bereich 4 - 6,5

10 ml Acrylamid (29,1 g auf 100 ml Aqua bidest.)

10 ml Bis (0,9 g auf 100 ml Aqua bidest)

30,5 ml Aqua bidest.

5 ml Glycerin

1,5 ml Ampholine^R pH 4 - 6

1,5 ml Ampholine^R pH 5 - 7

1,5 ml Persulfatlösung (1,5 g/100 ml H₂O)

Das Gel für den pH-Bereich 4 - 6,5 wurde alternativ auch mit 0,4 ml Riboflavin-Lösung (4 mg/100 ml) unter der UV-Lampe polymerisiert. In diesem Fall wurden 31,6 ml Aqua bidest. statt 30,5 ml zugegeben. Die mechanische Stabilität dieser Gele war allerdings schlechter als die der mit Persulfat polymerisierten.

Nach Probenaufgabe wurde ein konstanter Strom von 40 mA angelegt. Die Spannung lag bei 400 Volt. Nachdem die Spannung auf 900 Volt gestiegen war, wurde mit konstanter Spannung weiter gearbeitet. Die Versuchsdauer lag bei 2 Stunden.

Zur Bestimmung des pH-Gradienten wurden Gelstückchen (10 mm Ø) ausgestochen, 6 Stunden in 1 ml entgastem Aqua bidest. eluiert (Mikrogefäße unter Schütteln) und im Metrohm-pH-Meter der pH-Wert gemessen.

Färbung und Entfärbung erfolgte entsprechend den LKB-Application Notes.²¹

Dünnschicht-IFPAG mit den LKB-Ampholine^R-PAG-plates.

Die Arbeitsweise erfolgte exakt nach der allen Packungen beiliegenden Arbeitsanleitung.

Die Laufzeit wurde dabei jedoch auf 60 bis 70 Minuten bei maximal 40 mA beschränkt, was sich in allen Fällen als ausreichend erwies. Längere Laufzeiten führten zu einer Austrocknung der Gele, die dann häufig an den Elektroden verkohlten.

Hier wurden pH-Gradienten alternativ auch mit der Oberflächen-Elektrode von Ingold bestimmt.

2.8.2. Harnstoff-IFPAGs in Röhrchen.

Die Versuche wurden in den unter 2.7.0. beschriebenen Apparateanordnungen durchgeführt. Zum Einsatz kamen Röhrchen der Abmessung 75 x 5 mm, 120 x 6 mm und 160 x 9 mm (semipräparativ).

Folgende Gelsysteme wurden eingesetzt:

20,8 ml H₂O Bidest.

26,6 ml Acrylamid/Bis-Lösung

Analyt. IFPAG 30,0 g/100ml 0,8 g/100ml Aqua bidest.

Semipräp. IFPAG 22,2 g/100ml 0,6 g/100 ml Aqua bidest.

39 g Harnstoff

2 ml Ampholine^R pH 3 - 9

0,025 ml Temed

1,5 ml Per (15 mg/ml)

Als Kathodenflüssigkeit wurde 2%ige Äthanolaminlösung, als Anodenflüssigkeit 1,45%ige Orthophosphorsäure eingesetzt.

Die analytischen Harnstoff-IFPAGs wurden bei ca. 20 Volt per Röhrchen 2 bis 3 Stunden, die semipräparativen bei 300 Volt per Röhrchen 8 - 10 Stunden jeweils bei konstanter Spannung durchgeführt. Es wurden sowohl Versuche mit der oberen Elektrode als Kathode (Äthanolamin im oberen Gefäß) wie mit der oberen Elektrode als Anode (Phosphorsäure im oberen Gefäß) durchgeführt. Im letzteren Fall wurden die Proben mit 20%igem Glycerin überschichtet, bevor die Anodenflüssigkeit aufgefüllt wurde.

Die Probenvorbereitung erfolgte nach Epstein und Wolff⁷⁴. Bei der analytischen IFPAG wurden bis 100 µl, bei der semipräparativen bis 400 µl einer Proteinlösung der Konzentration 100 mg/ml (Bromcyan-Spaltpeptide) aufgebracht. Zur pH-Gradientenermittlung wurden Gele, die mitgelaufen waren, in 0,5 bis 1 cm lange Scheiben geschnitten, mit Aqua bidest. eluiert und der pH-Wert mit dem Metrohm-pH-Meter bestimmt. Die entsprechenden Schnittstellen wurden im probehaltigen Gel vor der Färbung mit dünnen Drahtstückchen, die durch das Gel gestochen wurden, markiert, so daß auch in dem nach dem Färben und Entfärben veränderten Gel die Banden einem bestimmten pH-Wert zugeordnet werden konnten. Gefärbt und entfärbt wurde zunächst nach Weber und Osborn¹⁶, später auch nach Blakesley und Boezi⁷⁶.

2.9.0. Spaltung von gereinigter PDC mit Bromcyan.

Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend den Angaben von Glossmann und Bode⁷³ gewählt. Der besseren Dosierung wegen wurde Bromcyan jedoch

nicht fest, sondern gelöst in 70%iger Ameisensäure zugegeben.

Die Konzentrationen im Reaktionsgemisch wurden nicht verändert (4 mg Protein und 4 mg Bromcyan/ml 70%ige Ameisensäure). Das Gemisch wurde 3 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und lyophilisiert wurde (Lyophilisator LZ - 70°, WKF Apparatebau Brandau).

D. Zusammenfassung

1. Alle zur Darstellung der Hefe-PDC in der Literatur bisher beschriebenen Verfahren wurden nachgearbeitet. Die Qualität der erhaltenen Präparate wurde mit SDS-PAGE, IFPAGs, Enzymtests (spez. Aktivität von PDC und verunreinigenden Fremd-enzymen) und weitgehend auch Tests auf Proteasenaktivität untersucht.

Dabei erwies sich das Verfahren zur PDC-Isolierung nach Ullrich⁴ überlegen, aber wegen der unzureichenden Ausschaltung der Proteasen A, B und C noch nicht ausreichend.

2. Neue Verfahren zur Endreinigung von Bierhefe-PDC wurden erprobt.
3. Das Verhalten der Hefeproteasen A, B und C auf den verschiedenen Stufen der Enzymdarstellung wurde beschrieben und die Wirksamkeit antiproteolytischer Maßnahmen untersucht.
4. Basierend auf den Ergebnissen von 2. und 3. wird ein verbessertes, optimiertes Verfahren zur Reinigung der Bierhefe-PDC angegeben.

Ausgehend von Rohenzym, das nach Ullrich⁴ dargestellt wurde, erfolgt eine Ammoniumsulfat-Gradienten-Elution des im Gel gefällten Enzyms. Die PDC-haltigen Fraktionen werden über Sepharose 6B filtriert. Auf verschiedenen Stufen der Reinigung wird das Präparat zur Reduktion proteolytischer Aktivität mit Phenylmethansulfonylfluorid behandelt.

5. Das Molekulargewicht der PDC wurde neu ermittelt. Es beträgt ca. 242.000 für das Holoenzym, ca. 119.000 für das Apoenzym und ca. 61.000 für die

Untereinheit. Damit muß, im Gegensatz zu bisher, von 4 Untereinheiten der PDC ausgegangen werden.

6. Der IEP der PDC wurde zu $5,3 \pm 0,05$ neu bestimmt. Der von Ludewig und Schellenberger³⁵ angegebene Wert von 5,8 wird nur bei weitgehend proteolytisch gespaltenem Enzym erreicht.
7. Gereinigte PDC-Präparate wurden mit BrCN gespalten und Möglichkeiten zur Trennung und Charakterisierung der Spaltpeptide aufgezeigt.

Insgesamt wurde mit der vorliegenden Arbeit eine - hoffentlich brauchbare - Plattform für weitere Arbeiten zur Aufklärung der Primärstruktur der PDC geschaffen.

E. Literaturverzeichnis

- ¹ Neuberg, C. und Karczag, L. (1911) Biochem. Z. 37 , 170
- ² Lohmann, K. und Schuster, P. (1937) Biochem. Z. 294 , 188.
- ³ Auhagen, E. (1932) Z. Physiol. Chem. 204 , 149.
- ⁴ Ullrich, J. (1970) Methods Enzymol. Vol. XVIII A, 110, Academic Press, New York.
- ⁵ Ullrich, J. und Kempfle, M. (1969) FEBS Letters 4 , 273.
- ⁶ Ullrich, J., Wittorf, J.H. und Gubler, C.J. (1966) Biochim. Biophys. Acta 113 , 595.
- ⁷ Ullrich, J., Wittorf, J.H. und Gubler, C.J. (1969) FEBS Letters 4 , 275.
- ⁸ Kremer, B. und Ullrich, J. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 , 189.
- ⁹ Holzer, H., Schulz, G., Villar-Palasi, C. und Jüntgen-Sell, J. (1956) Biochem. Z. 327 , 331.
- ¹⁰ Holzer, E., Söling, H.D., Goedde, H.W. und Holzer, H. in Bergmeyer, H.U. (1962) Meth. d. Enzymat. Anal., 602, Verlag Chemie Weinheim
- ¹¹ Ullrich, J. in Bergmeyer, H.U. (1970) Meth. d. Enzym. Anal. 2. Aufl., Bd. I, 470, Verlag Chemie Weinheim

- ¹²Ullrich, J. (1969) Habilitationsschrift, Freiburg
- ¹³Günther, T. (1969) Z. Naturforsch. 24b , 428
- ¹⁴Ullrich, J., Mündl. Mitteilung
- ¹⁵Shapiro, A.L., Viñuela, E. und Maizel, J.V. Jr (1967)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28 , 815.
- ¹⁶Weber, K. und Osborn, M. (1969) J.Biol. Chem.
244 , 4406.
- ¹⁷Steyn-Parvé, E.P. und Westenbrink, H.G.K. (1944)
Z. Vitaminforsch. 15 , 1.
- ¹⁸Gounaris, A.P., Turkenkopf, J., Buchwald, S. und
Young, A. (1971) J. Biol. Chem. 246 , 1302.
- ¹⁹Maurer, H.R. (1968) Disk-Elektrophorese,
Walter de Gruyter, 15.
- ²⁰Hjertén, S., Jerstedt, S. und Tiselius, A. (1965)
Anal. Biochem. 11 , 219.
- ²¹Karlsson, C., Davies, H., Öhmann, J. und Andersson
U.B. (1973) LKB Application Note
- ²²Bergmeyer, H.U. (1970) Meth. d. Enzymat. Anal.
2. Aufl. Bd. I , 471, Verlag Chemie Weinheim
- ²³Bergmeyer, H.U. (1970) Meth. d. Enzymat. Anal. 2. Aufl.
Bd. I , 393, Verlag Chemie Weinheim.
- ²⁴Wieland, O. (1958) Biochem. Z. 329 , 568.

- ²⁵Green, D.E. und Ziegler, D.M. (1963),
Methods Enzymol. Vol VI , 416
- ²⁶Boehringer-Mannheim GmbH (1973) Schriftliche Mitteilung
- ²⁷Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA (1973)
Schriftl. Mitteilung
- ²⁸Tiselius, A., Hjertén, S. und Levin, O. (1956)
Arch. Biochem. Biophys. 65 , 132.
- ²⁹Bernardi, G. und Kawasaki, T. (1968) Biochim.
Biophys. Acta 160 , 301.
- ³⁰Keilin, D. und Hartree, E.F. (1938) Proc. Roy.Soc.
Ser. B. 124 , 397.
- ³¹King, T.P. (1972) Biochemistry 11 , 367.
- ³²Porath, J. (1962) Nature 196 , 47.
- ³³Juni, E. und Heym, G.A. (1968) Arch. Biochem.
Biophys. 127 , 79.
- ³⁴Oba, K. und Uritani, J. (1975) J. Biochem. 77 ,
1205.
- ³⁵Ludewig, R. und Schellenberger, A. (1974) FEBS
Letters, 45 , 340.
- ³⁶Leitfaden zur Ionenaustauschchromatographie,
Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden.
- ³⁷Dernby, K.G. (1917) Biochem. Z. 81 , 107.

- ³⁸Pringle, J.R. (1975) Meth. in Cell Biology XII. Yeast cells, Academic Press New York.
- ³⁹Juni, E. und Heym, G.A. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 127 , 89.
- ⁴⁰Hayashi, R., Moore, S. und Stein, W.H. (1973) J. Biol. Chem. 248 , 2296.
- ⁴¹Hayashi, R., Oka, Y., Doi, E. (1967) Agr. Biol. Chem. 31 , 1102.
- ⁴²Kubowitz, F. und Lüttgens, W. (1941), Biochem. Z. 307 , 170.
- ⁴³Green, D.E., Herbert, D. und Subrahmanyam, V. (1941) J. Biol. Chem. 138 , 327.
- ⁴⁴Melnick , J.L. und Stern, K.G. (1940) Enzymologia 8 , 129.
- ⁴⁵Koike, M., Reed, L.J. und Carrol, W.R. (1963) J. Biol. Chem., 238 , 30.
- ⁴⁶Anson, M.L. und Mirsky, A.E. (1933), J.Gen. Physiol. 17 , 151.
- ⁴⁷Northrup, J.H., Kunitz, M. und Herriot, R.M. (1948), Crystalline Enzymes, 2nd ed. Columbia Univ. Press, New York.

- ⁴⁸Halsey, Y.D. und Neurath, H. (1955) J.Biol. Chem. 217 , 247.
- ⁴⁹Viswanatha, T. und Liener, J.E. (1955) J. Biol. Chem. 215 , 777.
- ⁵⁰Gold, A.M. und Fahrney, D. (1964) , Biochemistry 3 , 783.
- ⁵¹Balls, A.K. und Jansen, E.F. (1952) Advan. Enzymol. 13 , 321.
- ⁵²Fahrney, D.E. und Gold, A.M. (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85, 997.
- ⁵³Clark, J.F. und Jacoby, W.B. (1970) J.Biol. Chem. 245 , 6065.
- ⁵⁴Diezel, W., Böhme, H.-J., Nissler, K., Freyer, R., Heilmann, W., Kopperschläger, G. und Hofmann, E. (1973) Eur. J. Biochem. 38 , 479.
- ⁵⁵Saheki , T., Matsuda, Y. und Holzer, H. (1974) Eur. J. Biochem. 47 , 325.
- ⁵⁶Juni, E. Schriftliche Mitteilung.
- ⁵⁷Svedberg, T. (1937) Nature 139 , 1051.
- ⁵⁸Hedrick, J.L. und Smith, A.J. (1968) 126 , 155.

- ⁵⁹ Richterich, R. (1971) Klin. Chemie
3. erw. Aufl., 47, Verl. S. Karger, Basel.
- ⁶⁰ Richterich, R. (1971) Klin. Chemie
3. erw. Aufl. , 42, Verl. S. Karger, Basel.
- ⁶¹ Granath, K.A. und Flodin, P. (1961) Makromol. Chem.
48 , 160.
- ⁶² Wieland, Th., Duesberg, P. und Determann, H.,
(1963) Biochem. Z. 337 , 303.
- ⁶³ Auricchio, F. und Bruni, C.B. (1964) Biochem.Z.
340 , 321.
- ⁶⁴ Andrews, P. (1964) Biochem. J. 91 , 222.
- ⁶⁵ Determann, H. und Michel, W. (1966) J. Chromatogr.
25 , 303.
- ⁶⁶ Whitaker R. (1963) Anal. Chem. 35 , 1950.
- ⁶⁷ Gounaris, A.D., Turkenkopf, J., Civerchia , L.L.,
Greenlie, J. (1975) Biochim. Biophys. Acta
405 , 492.
- ⁶⁸ Katsuma, M., Inone, H., Izutani, M., Ulmura, E.,
und Sakakibara, E. (1969) Vitamins (Japan) 40(5), 345.
- ⁶⁹ Karlsson, Ch., Davies, H., Öhmann, J. und Andersson,
U.B. (1973) LKB Application Note 75.
- ⁷⁰ Bours, J. (1973) Science Tools, The LKB Instrument
Journal, 20(2-3) , 31.

- ⁷¹Michaelis, L., Róna, P. (1930) Prakt. der Physik. Chem., 4.Aufl. , 126.
- ⁷²Gross, E. und Witkop, J. (1961) J. Am. Chem. Soc. 83 , 1510.
- ⁷³Glossmann, H. und Bode, W. (1972) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 I , 298.
- ⁷⁴Epstein, H.F. und Wolff, J.A. (1976), Anal. Biochem. 76 , 157.
- ⁷⁵Bibring, T. und Baxandall, J. (1978) Anal. Biochem. 85 , 1.
- ⁷⁶Blakesley, R.W. und Boezi, J.A. (1977) Anal. Biochem., 82 , 580.
- ⁷⁷Righetti, P.G., Gianazza, E., Brenna, O. und Galante, E. (1977) J. Chromatogr. 137 , 171.
- ⁷⁸Frater, R.J. (1970) Chromatogr. 50 , 469.
- ⁷⁹Kaplan, L.J. und Foster, J.F. (1971) Biochemistry 10 , 630.
- ⁸⁰Wallevik, K. (1973) Biochem. Biophys. Acta. 322 , 75.
- ⁸¹Zechel, K. (1977) Anal. Biochem. 83 , 240.
- ⁸²Vesterberg, O. (1972) Biochim. Biophys. Acta 257 , 11.

- ⁸³Söderholm, J., Allestam, P. und Wadstrom, T.
(1972) FEBS Lett. 24 , 89.
- ⁸⁴ Righetti, P.G. und Drysdale, J.W. (1976)
Isoelectric Focusing, North-Holland Publ. Comp.,
Amsterdam, New York, 465.
- ⁸⁵ Ozols, J. and Craig, G. (1977) J. Biol.Chem.
252 , 5986.
- ⁸⁶ Crestfield, A.M., Moore, S. und Stein, W.H.
(1963) J. Biol. Chem. 238 , 622.
- ⁸⁷ Swank, R.T. und Munkres, K.D. (1971) Anal. Biochem.
39 , 462.
- ⁸⁸ Butler, P.J.G., Harris, J.I., Hartley, B.S. und
Lebermann, R. (1969) Biochem. J. 112 , 679.
- ⁸⁹ Weichselbaum, T.E. (1946) Amer.J. Clin.Path.16 ,
40.
- ⁹⁰ Lenney, J.F. (1956) J. Biol. Chem. 221 , 919.
- ⁹¹ Lee, Y.P. und Takahashi, T. (1966) Anal. Biochem.
14 , 71.
- ⁹² Chrambach, A., Reisfeld, R.A., Wykoff, M. und
Zaccari, J. (1967) Anal. Biochem. 20 , 150.
- ⁹³ Reisner, A.H., Nemes, P. und Bucholtz, C. (1975)
Anal. Biochem. 64 , 509.
- ⁹⁴ Malik, N. und Berrie, A. (1972) Anal.Biochem.49 ,173

⁹⁵Diezel, W., Kopperschläger, G. und Hoffmann, E.
(1972) Anal. Biochem. 48 , 617.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1972 bis November 1978 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.J. Ullrich am Biochemischen Institut der Universität Freiburg durchgeführt.

Da ich als externer Doktorant neben meiner beruflichen Tätigkeit arbeitete, vermißte ich die Anregungen und Diskussionen mit Kollegen an der Universität.

Umsomehr bin ich Herrn Prof. Dr.Ullrich für die stets gewährte, sehr hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit dankbar.

Frau Dorothea Trescher danke ich für die regelmäßige, sorgfältige Präparation von PDC-Rohenzym.

Lebenslauf

- 17.1.1940 in Oderberg-Stadt, Kreis Teschen
als Sohn des Werkmeisters Ernst
Freisler und seiner Ehefrau Hilde,
geb. Stanke geboren.
- 1945 Evakuierung nach Bayern
- 1946 - 1950 Besuch der Grundschule in Rain/Lech
- 1950 - 1959 Besuch des math. naturwiss. Gymnasiums
in Neuburg/Donau
- 1959 Reifeprüfung
- 1959 - 1965 Studium für das Höhere Lehramt in der
Fächerverbindung Biologie, Chemie,
Leibeserziehung
- 1965 Staatsexamen (1. Lehramtsprüfung)
- 1965 - 1966 Studienreferendar am Gisela-Gymnasium
in München und Kepler-Gymnasium in
Weiden/Opf.
- 1965 Heirat mit Frl. Margarete Scobel
- 1966 2. Lehramtsprüfung
- 1966 - 1970 Studienassessor und Studienrat am
Erasmus von Rotterdam Gymnasium in
Amberg
- 1970 Quittierung des Staatsdienstes,
Eintritt in die Fa.Gödecke, Freiburg,
Abt.Labordiagnostica

1976	Leiter der Abteilung Labordiagnostica
1978	Leiter der Hauptabteilung Marketing III

